5S RNS-Protein-Komplexe aus Bacillus stearothermophilus und Escherichia coli: Vergleich der Basensequenzen in den proteinbindenden Regionen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Zimmermann
aus Minden

1975

5S RNS-Protein-Komplexe aus Bacillus stearothermophilus und Escherichia coli: Vergleich der Basensequenzen in den proteinbindenden Regionen

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
des Fachbereiches Biologie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Jürgen Zimmermann
aus Minden

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H.G. Wittmann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E.R. Lochmann

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 12.7.1975

Druck: Zentrale Universitätsdruckerei, V a A 4

Inhaltsverzeichnis

A. Einleitung

B. Material und Methoden

1. Puffer, Lösungen und Material
2. Anzucht von Bacillus stearothermophilus (799) und Escherichia coli (A 19)
3. Präparation ribosomaler Untereinheiten
4. Anzucht ^{32}P markierter Zellen
5. Isolierung der 5S RNS durch die Platten-Gelelektrophorese
6. Präparation von 5S RNS-Protein-Komplexen
7. Methode der RNS Sequenzierung
8. Hydrolyse des 5S RNS-Protein-Komplexes

C. Resultate

1. Bindung der Komplexe auf dem Filter
2. (B.st. 5S RNS) $^{B.st.Protein}$-Komplex
3. (B.st. 5S RNS) $^{E.c.Protein}$-Komplex
4. (E.c. 5S RNS) $^{E.c.Protein}$-Komplex
5. (E.c. 5S RNS) $^{B.st.Protein}$-Komplex

D. Diskussion

1. Zur Ribonukleaseverdauung der Komplexe
2. B. stearothermophilus 5S RNS-Protein-Komplexe
3. E. coli 5S RNS-Protein-Komplex
4. Vergleiche zwischen 5S RNS-Protein-Komplexen

E. Zusammenfassung

F. Literaturverzeichnis

G. Abkürzungsverzeichnis

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547206_0083

A. Einleitung

Ribosomen sind Partikel, die zentral an der Proteinbiosynthese mitwirken. Einzelheiten ihrer Funktion sowie die räumliche Anordnung ihrer Bestandteile sind noch weitgehend unbekannt.

Neuere Erkenntnisse über Struktur und Funktion des Ribosoms sind in einer kürzlich erschienenen Serie von Übersichtsartikeln zusammengefaßt (Cold Spring Harbor Monograph Series "Ribosomes" 1974).

Um einen tieferen Einblick in die Wirkungsweise des Ribosoms zu gewinnen und Modellvorstellungen zu präzisieren, müssen die ribosomalen Bausteine in Sequenz und Struktur bekannt sein.

Die Ribosomen des Bakteriums Escherichia coli bestehen aus zwei Untereinheiten, die man nach ihrem Sedimentationsverhalten bei der Ultrazentrifugation als 30S und 50S Partikel bezeichnet. Die kleine Untereinheit enthält 21 verschiedene Proteine und eine Ribonukleinsäure von 16S, die große Untereinheit 34 voneinander verschiedene Proteine und zwei Ribonukleinsäuren von 23S und 5S.

Das 30S Partikel kann 'in vitro' in seine Einzelbestandteile zerlegt und wieder zu einer voll funktionsfähigen Ribosomenuntereinheit rekonstituiert werden (Nomura 1970). Eine vollständige Rekonstitution der großen Untereinheit wurde zuerst an Bacillus stearothermophilus durchgeführt (Nomura und Erdmann 1971), während die 50S Untereinheit aus E. coli erst 1974 rekonstituiert werden konnte (Nierhaus und Dohme 1974).

Die Aufklärung der Primärstrukturen der 5S RNS (Brownlee und Sanger 1968) und der 16S RNS (Fellner et al. 1972) sowie einiger ribosomaler Proteine (Wittmann-Liebold 1973, Reinbolt und Schiltz 1973, Stadler 1974) schaffen die Basis eines detaillierteren Studiums der Protein-RNS-Wechselwirkung innerhalb des Ribosoms.

Aus den bisherigen Ergebnissen über die Protein-RNS-Wechselwirkung (Schaup et al. 1971, Zimmermann et al. 1972, Gray et al. 1973) konnten bereits einige interessante Schlüsse gezogen werden. Aufgrund der bekannten 16S RNS Basensequenz und der daraus postulierten Sekundärstruktur (Fellner et al. 1972, Zimmermann et al. 1972) konnten die Bindungsstellen einiger ribosomaler Proteine als vorwiegend basengepaarte Bereiche innerhalb der RNS lokalisiert werden. Ähnliche Untersuchungen wurden an der 5S RNS und ihren Bindungsproteinen durchgeführt (Gray et al. 1973). Auch hier treten die Proteine ebenfalls mit als basengepaart postulierten Regionen der 5S RNS Sequenz in Wechselwirkung.

Da von E. coli und B. stearothermophilus die 5S RNS Sequenzen und die Bindungsproteine bekannt sind (Horne und Erdmann 1972), war es ein Ziel dieser Arbeit, die Bindungsstellen für die Proteine an der 5S Ribonukleinsäure zu vergleichen.

Die 5S RNS wurde zuerst 1963 als Bestandteil der 50S Untereinheit von E. coli entdeckt (Rosset und Monier 1963). Später wurde sie in allen prokaryontischen und eukaryontischen Ribosomen gefunden. In allen

Organismen besitzt die 5S RNS eine Kettenlänge von ungefähr 120 Nukleotiden. Sie enthält im Gegensatz zu den übrigen Ribonukleinsäuren kein methyliertes oder auf andere Weise modifiziertes Nukleotid.

Da die 5S RNS leicht ^{32}P markiert zu erhalten ist, wurde sie als erste ribosomale RNS vollständig sequenziert. Inzwischen wurde die Primärstruktur einer Reihe verschiedener prokaryontischer und eukaryontischer 5S Ribonukleinsäuren aufgeklärt. Vergleichsstudien von verschiedenen bakteriellen 5S RNS-Arten zeigten, daß gewisse Sequenzen wiederholt auftreten (Sogin et al. 1972, Erdmann 1975), während andere Partialsequenzen stark voneinander abweichen. Es wurden sogar gewisse Sequenzübereinstimmungen zwischen E. coli 5S RNS und der 5S RNS von KB-Zellen gefunden (Brownlee et al. 1972, DuBy und Weissman 1971).

Mit der Anzahl der sequenzierten 5S RNS-Arten stieg auch die Zahl der vorgeschlagenen Strukturmodelle (Boedtker und Kelling 1967, Cantor 1967, Brownlee et al. 1968, Madison 1968, DuBy und Weissman 1971, Richards 1969, Jordan 1971, Kearns und Wong 1974). Diese Modelle sind fragwürdig; denn in ihnen wurden die funktionelle Bedeutung und Interaktion der Proteine nicht berücksichtigt.

Physikalische Messungen an E. coli 5S RNS in Lösung zeigten wenig übereinstimmende Ergebnisse. Die Anzahl der vorausgesagten Basenpaarungen liegt für E. coli 5S RNS zwischen 15-49.

Limitierte Enzymspaltungen der 5S RNS führten zu unterschiedlichen Ergebnissen. So zeigte Jordan (1971), daß als erste Base der 5S RNS G_{41} (bzw. G_{44}) hydrolysiert wird, während Marzabekov und Griffin (1972) G_{61} feststellten. Übereinstimmend jedoch scheint der konstante Bereich D (siehe Abb. 15) leicht für RNasen zugänglich zu sein.

Es ist bemerkenswert, daß im intakten Ribosomen die 5S Ribonukleinsäure gegen RNase-Angriff resistent ist.

Untersuchungen mit Glyoxal und Kethoxal haben gezeigt, daß hauptsächlich G_{41} modifiziert wird (Bellemare 1972, Lité 1973). Werden 50S und 70S analog umgesetzt, so findet man die Modifikation der Base G_{41} der 5S RNS in beiden Fällen. Diese Ergebnisse besagen, daß G_{41} im Ribosom zwar den genannten chemischen Agentien, nicht jedoch Ribonukleasen zugänglich ist.

Monoperphtalsäure erlaubt die Modifizierung von nicht basengepaarten Adeninen zum 1-N-Oxyd. Die so modifizierten Adenine können keine Basenpaarung eingehen (Cramer und Erdmann 1968). In freier 5S RNS konnten 10 Adenine modifiziert werden, während in der 5S RNS am Ribosom nur zwei Adenine zugänglich waren (Erdmann et al. 1973). Die im Ribosom zugänglichen zwei Adenine scheinen funktionell wichtig zu sein. So wurde gefunden, daß 5S RNS-Protein-Komplexe das t-RNS Fragment TYCG binden können. Während die im Ribosom modifizierte 5S RNS in Wechselwirkung mit den Proteinen treten kann, geht sie keine Bindung mit dem t-RNS Fragment ein.

Schon frühzeitig wurde von Forget und Weissman (1967) auf diese mögliche Wechselwirkung hingewiesen. Diese Theorie wurde nicht nur durch die oben genannten 5S RNS-Komplexstudien, sondern auch durch die Inhibierung der Bindung von t-RNS (TYCG) an das Ribosom erhärtet (Ofengand und Henes 1969, Shimizu et al. 1970, Erdmann et al. 1974, Grummt et al. 1974). Zusammen mit den t-RNS Bindungsstudien konnte gezeigt werden, daß TYCG spezifisch an der ribosomalen 'A-site' bindet und die Synthese von ppGpp und pppGpp erlaubt (Richter et al. 1974).

Funktionsstudien an 5S RNS-Protein-Komplexen aus B. stearothermophilus (Horne und Erdmann 1973 und 1974), E. coli (Gaunt-Klöpfer und Erdmann 1975) und Rattenleber (Grummt et al. 1974) haben gezeigt, daß diese Komplexe ATP und GTP spalten können. Versuche mit Antibiotika unterstützen die Vorstellung, daß diese enzymatischen Aktivitäten zusammen mit weiteren Faktoren auftreten können.

Neueste Ergebnisse von Möller und Mitarbeiter (Cold Spring Harbor, Monograph Series "Ribosomes" 1974) unterstreichen die oben genannten Befunde; denn Affinitätsmarkierungen mit GDP-Analoga zeigten, daß primär die 5S RNS Bindungsproteine reagieren.

Daß die 5S RNS für die Funktion der 50S Untereinheit eine wesentliche Rolle spielt, wurde in Rekonstitutionsversuchen gezeigt, in denen Partikel ohne 5S RNS biologisch weitgehend inaktiv waren (Erdmann et al. 1971). Weitere Rekonstitutionsversuche von Wrede und Erdmann (1973) bewiesen, daß 9 verschiedene prokaryontische, aber keine von

6 getesteten eukaryontischen 5S RNS-Arten in die B. stearothermophilus Untereinheit eingebaut werden konnten. Da die prokaryontischen 5S RNS-Spezies in das B. stearothermophilus 50S Ribosom eingebaut werden und biologisch aktiv sind, kann man daraus folgern, daß in bakteriellen 5S Ribonukleinsäuren insbesondere die Sequenzen der Erkennungsregionen für die ribosomalen Proteine erhalten sind.

Die bisherigen Ergebnisse kennzeichnen die Bedeutung der 5S RNS für die Struktur und Funktion in der Proteinbiosynthese. Um die Funktion der 5S RNS besser zu charakterisieren, ist es wesentlich, ihre Struktur im Ribosom zu kennen. Dafür sind die Informationen über die 5S RNS in Lösung nicht ausreichend, da man annehmen kann, daß die RNS ihre Struktur durch Wechselwirkung mit den Proteinen ändert (Araco et al. 1975). Konformationsänderungen dieser Art sind ganz allgemein molekularbiologisch bedeutsam, aber schwer nachzuweisen. Die beschriebenen 5S RNS-Protein-Komplexe aus E. coli und B. stearothermophilus stellen ein geeignetes System für Untersuchungen dieser Art dar. Ein möglicher experimenteller Ansatz bietet sich in der gezielten chemischen Modifikation der RNS-Komponente zusammen mit strukturellen und funktionellen Untersuchungen. Da die bekannten chemischen Reaktionen nur begrenzt anwendbar sind, ist es sinnvoll, die natürlichen Variationen in der 5S RNS, die durch Evolutionen entstanden sind, auszunutzen.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit ist:

a) die durch Proteine vor RNase-Angriff geschützten Sequenzbereiche der E. coli bzw. B. stearothermophilus 5S RNS-Komplexe zu bestimmen und

b) diese Bereiche mit den nach RNase-Verdauung der heterologen 5S RNS-Protein-Komplexe entstehenden Regionen zu vergleichen.

B. Material und Methdoden

B.1. Puffer, Lösungen und Materialien

TMA I: 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°C); 10 mM $MgCl_2$; 30 mM NH_4Cl; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

TMA II: wie TMA I, jedoch 0,3 mM $MgCl_2$.

TR I: 30 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°); 20 mM $MgCl_2$; 1 M KCl; 6 mM 2-Mercaptoäthanol.

TR O: wie TR I, jedoch ohne KCl.

TR: TR I : TR O = 1 : 2.

UTMMK 30: 6 M Harnstoff; 10 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°C); 1mM $MgCl_2$; 6 mM 2-Mercaptoäthanol; 0,3 mM KCl.

UTMMK 25: wie UTMMK 30, jedoch 0,25 M KCl.

TEB-Puffer: 80 mM Tris-HCl, pH 7,4 (23°); 0,1 M Borsäure; 2 mM Na_2EDTA.

10% Polyacrylamidgel-Lösung:

10% Polyacrylamid; 0,2% Bisacrylamid; 5% Saccharose; 0,1% TEMED Katalysator; 10% Ammoniumpersulfat.

Harnstoff-Polyacrylamidgel-Lösung (12%):

12% Polyacrylamid; 0,12% Bisacrylamid; 0,1% TEMED; 10% Ammoniumpersulfat.

RNS-Isolierpuffer:

0,02 M Tris-HCl, pH 7,4 (23°); 0,o2 M Magnesiumacetat.

B.1.2. Hochspannungselektrophorese-Puffer:

1. Dimension:

7 M Harnstoff; 50 mM Na_2EDTA; pH 3,5 (Eisessig).

2. Dimension:

7% Ameisensäure; pH 1,9.

Trennung der Nukleotide:

0.5% Pyridin; 5% Eisessig; pH 3,5.

Eluierung der Nukleotide:

70% Triethylamin; pH 10)CO_2).

B.1.3. Materialien:

^{32}P-Orthophosphat; Amersham, England

T1-RNase; Sankyo, Japan

T1-RNase; Böhringer, Deutschland

T1-RNase; Sigma, USA

Pankreatische RNase; Böhringer, Deutschland

Millipore-Filter; Millipore Ltd., England

Zellulose-Azetat; Oxoid Ltd., England

DEAE-Zellulose-Papier; Whatman DE 81

3 MM Papier

Röntgenfilme; Agfa: Curix RPI

B.2.1. B. stearothermophilus

Nährmedium pro Liter: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10 g Natriumchlorid, 10 g Glukose, 0,1 mg Manganchlorid. Der pH wurde mit Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt. In einem New Brunswick Fermenter wurden 10 Liter steriles Medium mit einer 400 ml Vorkultur bei 61° C angeimpft. Das Wachstum der Zellen wurde bei 650 nm optisch verfolgt. Bei einer Absorption von 0,5-0,6 kühlte man das Nährmedium mit Eis auf 4-10° C ab. Diese Bakterien wurden mit 10 000 U.p.M. eine Stunde bei 4° C in einem Sorvall GSA Rotor abzentrifugiert. Unter optimalen Bedingungen hat B. stearothermophilus bei 61° C eine Generationszeit von 12-18 Minuten.

B.2.2. E. coli (A 19)

Nährmedium pro Liter: 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 7 g Natriumchlorid, 10 g Glukose.
In einem New Brunswick Fermenter wurden 10 Liter steriles Medium mit einer 400 ml Vorkultur bei 37° C angeimpft und bei einer Absorption von 0,6 (650 nm) auf 4-10° C gekühlt und geerntet.

B.3.1. Isolierung ribosomaler Untereinheiten

Die eingefrorenen Zellen (B. stearothermophilus oder E. coli) wurden mit der doppelten Menge Aluminiumoxyd (Alcoa) verrührt, bis eine gleichmäßige Paste entstand. Die auf diese Weise aufgebrochenen Zellen wurden in TMA I Puffer (plus 1µg ribonukleasefreie DNase pro ml) suspendiert und für 15 Minuten bei 4° C und 15 000 U.p.M. zentrifugiert (Sorvall). Der Überstand wurde in Eiswasser aufbewahrt und das Sediment noch einmal in TMA I resuspendiert. Nach einer weiteren Zentrifugation wurde der zweite Überstand mit dem ersten vereinigt und in einer Spinco-Zentrifuge (Rotor Nr. 30) bei 20 000 U.p.M. und 4° C für 30 Minuten zentrifugiert. Der letzte Überstand stellt den rohen Zellextrakt dar.

Die 70S Ribosomen wurden aus dem Rohextrakt durch Ultrazentrifugation (Spinco, Rotor 60 Ti, 50 000 U.p.M.) isoliert. Die im Sediment befindlichen 70S Ribosomen wurden in TMA II gelöst. Die in diesem Puffer dissoziierten Ribosomen wurden durch Zonalzentrifugation nach Eikenberry (1970) in ihre Untereinheiten getrennt.
Der hierfür benützte Sucrosegradient enthielt 6-38 % Saccharose in TMA II Puffer. Eine typische Trennung ist in Abb. 1 wiedergegeben.
Die in der Zonalzentrifugation aufgetrennten Untereinheiten wurden durch Zugabe von Magnesiumchlorid auf TMA I Bedingungen gebracht und für 17 Stunden bei 4° C und 40 000 U.p.M. abzentrifugiert. Die reinen 30S und 50S Ribosomen wurden wiederum in TMA I gelöst und bei -80° C eingefroren.

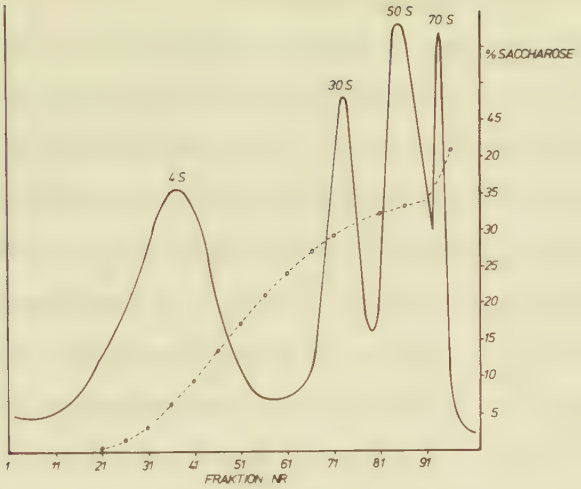


Abb. 1: Auftrennung von 30S und 50S Untereinheiten durch Zonalzentrifugation.

B.4. Anzucht ^{32}P markierter Zellen

B.4.1. E. coli

Dieses Nährmedium enthielt im Gegensatz zum Vollmedium eine geringere Menge an Phosphationen. Es wurde in drei getrennt sterilisierten Lösungen angesetzt:

Lösung A: 1.5 g KCl; 5 g NaCl; 1 g NH_4Cl; 2 g vitaminfreie Casaminosäure (Difco); 2 g Bactopepton (Difco); 12,1 g Tris; alle Angaben pro Liter. Der pH wurde mit HCl auf 7,4 eingestellt.

Lösung B: 20 % Glukose.

Lösung C: 0,1 M Magnesiumsulfat.

Das vollständige Medium enthielt 100 ml Lösung A, 2 ml Lösung B, 1 ml Lösung C. Eine 20 ml Vorkultur wurde mit E. coli (A 19) Zellen angeimpft und wuchs über Nacht bei 37° C. 1 ml dieser angewachsenen Zellkultur wurde in ein 250 ml Erlenmeyergefäß mit 100 ml Nährmedium übertragen, das 10-20 mCi trägerfreies ^{32}P enthielt. Diese Kultur wuchs ebenfalls bei 37° C. Unter diesen Bedingungen zeigte die Kultur eine Generationszeit von 25 Minuten, und nach drei Stunden waren mehr als 50 % des radioaktiven Phosphates in den Zellen eingebaut. Die Aufnahme von ^{32}P durch die Zellen wurde durch Filtration geringer Mengen Kultur durch einen Millipore-Filter gemessen. Die Zellen wurden in der frühen exponentionellen Log-phase (60-80 % Einbau) abzentrifugiert und bei -20° C aufbewahrt.

B.4.2. B. stearothermophilus

Um das 'kalte' Phosphat im Nährmedium zu reduzieren, wurde eine 5 % Hefeextraktlösung (denn nur diese Lösung enthielt in den unter B.2.1. angeführten Medien Phosphat) mit 10 mM $MgCl_2$ versetzt und der pH mit Ammoniak auf 9 eingestellt. Da das Magnesiumsulfat unter diesen Bedingungen ausfällt, kann es durch Zentrifugation entfernt werden. Das somit phosphatfreie Nährmedium wurde dann wie unter B.2.1. angesetzt.

Da B. stearothermophilus nur bei pH 7 oder höher wächst, mußte das trägerfreie radioaktive Phosphat (pH 5-6) mit NaOH neutralisiert werden.

Die Vorkultur enthielt 20 ml des phosphatreichen Mediums und wuchs über Nacht bei 60° C. 1 ml dieser Vorkultur wurde auf eine zweite übertragen, die nach 2-3 Stunden die frühe Logphase erreichte. Danach wurde 1 ml der zweiten Vorkultur in ein Erlenmeyergefäß mit 100 ml Nährmedium (ohne Phosphat, mit 40-50 mCi ^{32}P) übertragen. Nach einer Stunde wuchsen die Zellen mit einer Generationszeit von 20 Minuten.

Wie aus Abb. 2 zu erkennen ist, verläuft die Wachstumskurve mit dem ^{32}P enthaltenden Medium nicht identisch mit der Kurve des Vollmediums, obgleich die Generationszeiten ähnlich sind.

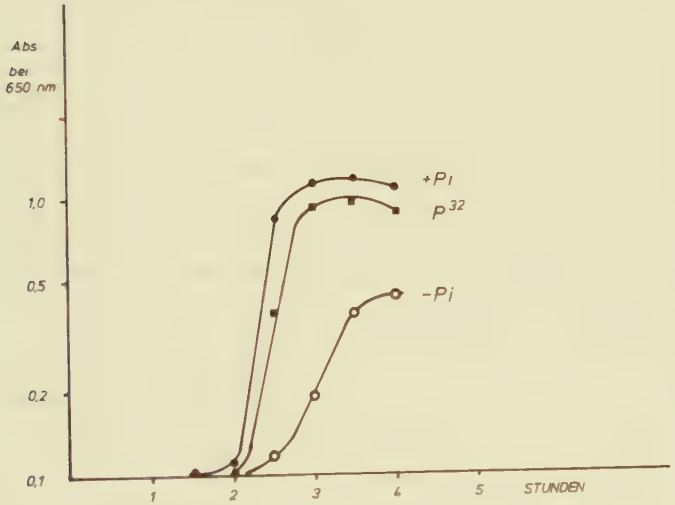


Abb. 2: Wachstumskurven von B. stearothermophilus im Vollmedium (●—●), von Phosphat befreites Vollmedium (○—○) und im Mangelmedium mit ^{32}P Phosphat (■—■).

Der Millipore-Test mit einem kleinen Aliquot der ^{32}P markierten Zellen ergab nach drei Stunden einen Einbau von 20-30 % des radioaktiven Phosphates. Die Zellen wurden zu diesem Zeitpunkt (mittlere Logphase) abzentrifugiert und bei -20° C eingefroren.

Neben verschiedenen getesteten Nährmedien mit geringem Phosphatanteil ergab folgendes Medium (in Abwandlung nach Bellemare 1973) einen besseren Einbau an ^{32}P als im vorher genannten Medium:

Vollmedium: 2 g $(NH_4)_2SO_4$; 0,2 g $MgSO_4$ und 15 g Hefeextrakt pro Liter. 0,2 M Tris; 10 % Glukose; 10 % KH_2PO_4; 0,01 mM $FeSO_4$; 0,1 mM $MnCl_2$; pH 7,2.

Das Mangelmedium besaß bis auf eine Veränderung dieselbe Zusammensetzung wie das Vollmedium: es wurden nur 1,5 g Hefeextrakt pro Liter benutzt.

Das Einimpfen der Vorkultur in das ^{32}P enthaltende Mangelmedium erfolgte nach den Bedingungen, wie sie unter B.2.1. angegeben sind. Die Wachstumskurve für B. stearothermophilus ergab in diesem Medium einen ähnlichen Verlauf, wie sie auf Abb. 2 zu sehen ist. Die Zellen wurden wiederum in der mittleren Logphase geerntet und bei -20° C eingefroren.

B.5. Präparation der ^{32}P 5S RNS auf der Platten-Gelelektrophorese

B.5.1. Isolierung der ^{32}P 5S RNS

Die tiefgefrorenen Zellen wurden mit zweifachem Überschuß (B. stearothermophilus = vierfach) an Alcoa in einem Zentrifugenröhrchen mit einigen Tropfen RNS-Isolierpuffer (Ribonuklease-freie DNase, 1 µg/ml) mit einem Glasstab 5 Minuten auf Eis zerrieben, in 2 ml RNS-Isolierpuffer aufgenommen und bei 10 000 U.p.M. 30 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde noch einmal gewaschen und nochmals zentrifugiert. Beide Überstände vereinigte man und ließ sie mit gleichem Volumen an Phenol (RNS-Puffer gesättigt) 20 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Vortex schütteln. Durch Zentrifugation wurde die Phenolphase von der wässrigen Phase getrennt und ein weiteres Mal mit Puffer extrahiert. Dieser Vorgang wiederholte sich zweimal. Die wassrigen Phasen wurden vereinigt, und die RNS wurde mit zweifachem Überschuß an Äthanol bei -20° C über Nacht gefällt.

B.5.2. Trennung der RNS auf dem Gel

Zur Trennung der RNS wurde ein Gelplattengerät benutzt in Anlehnung an Jorden (1971). Der Apparat besteht aus zwei Glasplatten (40 x 40 cm), die seitlich durch einen schmalen Glasstreifen (0,2 x 40 cm) getrennt und mit zwei Klammern zusammengehalten wurden. Die Glas-

platten stellt man in einen Pufferbehälter. Der obere Teil der Platte wird durch ein Stück Chromatographierpapier (Whatman 3 MM) mit einem zweiten Behälter verbunden, dessen Flüssigkeitsniveau höher ist als das der Glasplatten. Beide Pufferkammern werden an ein Netzgerät angeschlossen. Der Zwischenraum der Glasplatten wurde zur Trennung aller ribosomaler RNS mit einem 10 % und anschließend mit einem 3,2 % Polyacrylamidgel gefüllt.

Die nach der Äthanolfällung abzentrifugierte RNS wurde im TEB-Puffer resuspendiert (20 % Saccharose, Bromphenolblau als Farbmarkierung) und in die im Gel eingelassenen Öffnungen mit einer feinen Kapillare aufgetragen. Die Elektrophorese lief so lange (400 V, 25 mA, 4° C), bis die Farbmarkierung fast den unteren Rand der Gelplatte erreicht hatte. Dann wurde das Gel von den Glasplatten gelöst, mit Parafilm umwickelt und je nach Stärke der radioaktiv markierten RNS 2 - 5 Minuten auf einen Röntgenfilm gelegt. Das auf dieser Art entwickelte Autoradiogramm zeigt recht deutlich die vier verschiedenen Ribonukleinsäuren (Abb. 3).

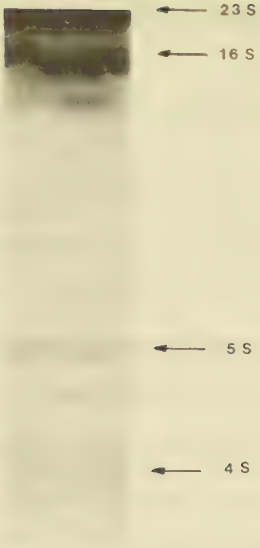


Abb. 3: Autoradiographie der r-RNS auf einem 10 % und 3,2 % Polyacrylamid-Plattengel

B.5.3. Isolierung der 5S RNS

Die auf dem Autoradiogramm bestimmte 5S RNS Bande wurde aus der Gelplatte herausgeschnitten und zum Zerkleinern durch eine sterile Spritze gepreßt. Diese Gelstückchen wurden dann in 2-5 ml 0,6 M NaCl aufgenommen und bei 4° C über Nacht auf einem Magnetrührer homogenisiert. Danach wurde das Homogenat abzentrifugiert und die RNS enthaltende Lösung über einen Millipore-Filter von den restlichen Gelstückchen befreit. Die RNS wurde mit dreifachem Überschuß an Äthanol über Nacht bei -20° C gefällt, abzentrifugiert und unter Vakuum getrocknet.

B.6. Präparation der 5S RNS-Protein-Komplexe

B.6.1. Extraktion der 50S Proteine

Ribosomale Proteine kann man von der 23S und 5S RNS in 48 Stunden bei 0° C durch Zugabe von einem äquivalenten Volumen 8 M Harnstoff, das 4 M LiCl enthält, von einer 50S Ribosomenlösung dissoziieren. Bei E. coli 50S Untereinheiten wurden unter diesen Bedingungen die 23S und 5S RNS quantitativ ausgefällt und anschließend abzentrifugiert. Bei den B. stearothermophilus 50S Untereinheiten können unter diesen Bedingungen nicht alle 50S Proteine von der 23S RNS gelöst werden. Ein Protein, B-L3, bleibt quantitativ an der RNS gebunden (Erdmann et al. 1971). Ferner fällt die 5S RNS bei B. stearothermophilus nur zu 30 % aus; der Rest bleibt im Proteinüberstand (UTP 50 Fraktion) in Lösung (Horne und Erdmann 1972). Daher wurde die UTP 50 Fraktion von B. stearothermophilus gegen UTMMK 25 Puffer bei 6° C 4 Stunden dialysiert und dann auf eine DEAE-Zellulose Säule (0,7 x 2,5 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit UTMMK 30 Puffer gewaschen, bis das Eluat bei 280 nm keine Absorption mehr zeigte. Die Protein enthaltenden Fraktionen wurden gesammelt und als 'AB' Fraktion bezeichnet. Sie enthält alle 50S Proteine, ist aber frei von 5S RNS.

B.6.2. Rekonstituierte 5S RNS-Protein-Komplexe

3,5 A_{260} Einheiten 5S RNS (E. coli oder B. stearothermophilus) wurden mit 100 Ä.E. (äquivalenten Einheiten) Proteinen von E. coli oder B. stearothermophilus bei 40° C in TR Puffer inkubiert (oder bei 0° C 12 Stunden) und 30 Minuten auf Eis aufbewahrt.

Untersucht wurden folgende 5S RNS-Protein-Komplexe:

1. (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex
2. (B.st. 5S RNS)$^{E.c.Protein}$-Komplex
3. (E.c. 5S RNS)$^{E.c.Protein}$-Komplex
4. (E.c. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex

B.6.3. Filter-Test der Komplexe

Auf dem Millipore-Filter wurde zunächst 5S RNS gegeben, der Filter mit 3 ml TR Puffer durchspült und die Radioaktivität (^{32}P nach Cerenkov oder mit Szintillationsflüssigkeit) in einem Szintillationszähler (Beckman LS 100) bestimmt. Dann wurde der gleiche Vorgang mit dem RNS-Protein-Komplex wiederholt und ebenfalls die Radioaktivität bestimmt.

B.7. RNS-Sequenzierung

Die Bestimmung der 5S RNS-Sequenz wurde nach der Methode von Brownlee, Sanger und Barrel (1968) durchgeführt. Die RNS wird in verschieden große Bruchstücke gespalten. Das geschieht mit Enzymen, die möglichst spezifisch nach bestimmten Nukleotiden die RNS-Kette hydrolysieren. Als sehr spezifisch erwies sich die T1-Ribonuklease. Sie spaltet ohne nennenswerte Nebenreaktionen nach Guanidin. Diese Reaktion verläuft über ein zyklisches 2' 3' Phosphat zu einem 3' Phosphat. Als zweites, nicht ganz so spezifisches Enzym wurde die pankreatische Ribonuklease benutzt. Sie spaltet nach Pyrimidinen, also nach Cytidin und Uridin. Der Reaktionsmechanismus verläuft wie bei der T1-RNase über das zyklische 2' 3' Phosphat zum 3' Phosphat.

Die mit T1-RNase bzw. pankreatischer RNase gespaltenen Produkte der 5S RNS werden in einer zweidimensionalen Hochspannungselektrophorese getrennt. In der 1. Dimension erlaubt ein Zelluloseazetatstreifen eine sauberere Trennung der Oligonukleotide als sie auf Papier zu erreichen ist. Zum anderen ist Zelluloseazetat für die Fraktionierung kleinerer RNS Mengen wesentlich besser geeignet. Da die Kapazität von Zelluloseazetat gering ist, ist es für die Trennung radioaktiv markierter Oligonukleotide wichtig, geringe Mengen in einem kleinen Volumen aufzutragen. Die Hochspannungselektrophorese der 2. Dimension auf DEAE-Papier in einem sauren pH (pH 1,7 bzw. pH 1,9) beruht auf zwei wesentlichen Punkten der Nukleotidtrennung:

1. Ionen-Austauschchromatographie
2. Ladungsunterschiede

Gute Ergebnisse erreicht man nach dieser Methode mit der T1-Ribonuklease und der pankreatischen RNase. Mit beiden Nukleasen wurden kaum zyklische Nukleotide gefunden.

Die Bedingungen für die Enzymspaltung sind in beiden Fällen identisch. Es wurde ein Enzym: Substrat Gewichtsverhältnis von 1 : 10 bzw. 1 : 20 in 0,01 M Tris Puffer, der 0,001 M EDTA enthielt, benutzt. In den meisten Fällen wurde Träger-RNS dazugegeben, um eine Endkonzentration von 10 µg RNS zu erhalten. Enzym und RNS wurden in einer feinen Kapillare in 2-10 µl für 20 Minuten bei 37° C inkubiert und sofort auf den Zelluloseazetatstreifen von 3 cm Breite und 45 cm Länge aufgetragen. Seitlich auf dem Streifen wurde als Farbpunkt eine Mischung von Xylencyanol (blau), Fuchsinsäure (rot) und Methylorange (gelb) aufgetragen. Hatte der blaue Farbton die Hälfte des Zellulosestreifens bei 3 000 Volt durchlaufen, wurde die Elektrophorese abgebrochen und die 1. Dimension auf das zweite Chromatographierpapier (DEAE-Papier 30 x 90 cm) übertragen.

Das Übertragen der Oligonukleotide vom Zelluloseazetatstreifen auf das DEAE-Papier der 2. Dimension erfolgte mittels einiger mit Wasser durchtränkter Papierstreifen (Whatman 3 MM). Diese wurden auf den Zellulosestreifen gelegt, der das DEAE-Papier in sieben cm Entfernung vom unteren Rand bedeckte, und wurde dann langsam mit einer Plexiglasplatte zusammengepreßt. Das Wasser drang durch den

Zelluloseazetatstreifen in das DEAE-Papier ein, und die negativ geladenen Oligonukleotide blieben am DEAE-Papier hängen. Man kann auf diese Weise rund 90 % des radioaktiven Materials vom Zelluloseazetatstreifen auf das DEAE-Papier übertragen.

Der am Papier haftende Harnstoff wurde mit einer 80 %igen Äthanollösung ausgewaschen und das Papier getrocknet. Nachdem das DEAE-Papier mit dem Puffer der 2. Dimension durchtränkt war, konnte an beiden Seiten die Farbmarkierung aufgetragen werden. Zum Auftrennen der Oligonukleotide in der 2. Dimension mußte die Elektrophorese bei 1200 V 12 Stunden lang laufen. Nach dem Trocknen des Papieres wurde ein Röntgenfilm auf das Chromatographierpapier gelegt und der Film je nach Stärke der radioaktiven Strahlung 1 - 2 Wochen entwickelt. Die durch Autoradiographie erhaltenen Flecken wurden nach der Methode von Brownlee, Sanger und Barrel (1968) zugeordnet, aus dem Papier ausgeschnitten und in einem Szintillationszähler im Cerenkov-Verfahren gezählt.

Die Position eines Nukleotides auf diesem Film, der Nukleotidkarte ('Fingerprint'), ist durch seine Zusammensetzung bestimmt. Abb. 4 zeigt die Beziehung zwischen der Zusammensetzung eines Nukleotides und seiner Position in der 2. Dimension. Aus Nukleotidanalysen weiß man, daß Uracil von allen Basen die größte Mobilität auf dem DEAE-Papier hat. Daher läßt sich der 'Fingerprint' in drei verschiedene Abschnitte einteilen, die entweder kein, ein oder zwei Uracil-Reste ent-

halten. Wie aus Abb. 4 ersichtlich, wird von der Position des Guanins zur Position des Cytidins eine Linie durch die Punkte 1, 2, und 3 gelegt. Punkt 1 auf dieser Linie entspricht dem Oligonukleotid CG, Punkt 2 dem Oliginukleotid CCG und Punkt 3 CCCG. Analog lassen sich so die anderen Punkte zuordnen.

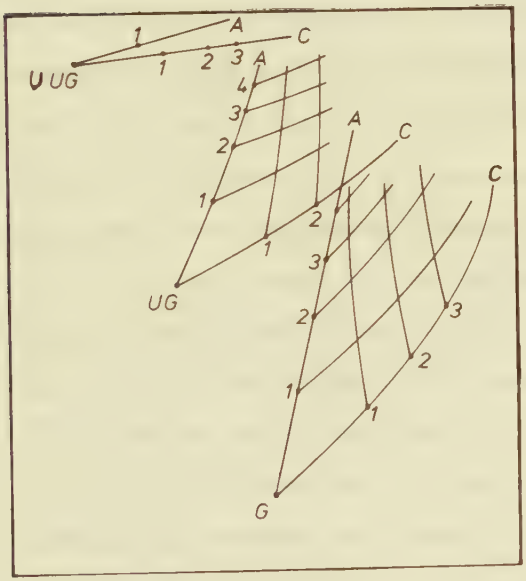


Abb. 4: Schematische Darstellung eines 'Fingerprints' nach Brownlee, Sanger und Barrel (1968).
Die RNS wurde mit T1-RNase gespalten und in der 2. Dimension bei pH 1,9 in der Hochspannungselektrophorese getrennt.

Für eine weitere Analyse der Oligonukleotide ist es notwendig, die Nukleotide vom Papier zu eluieren. Das geschieht mit Triäthylamin. Das Papierstück mit den Oligonukleotiden würde mit Triäthylamin befeuchtet, zwischen zwei Mikroskopgläsern gelegt, die in einem Glasbehälter mit Triäthylamin eingetaucht sind. Am oberen freien Ende des Papieres legte man eine feine Kapillare an, die die Oligonukleotide vom Papier aufsaugt. Die in Triäthylamin gelösten Oligonukleotide wurden im Exsikkator unter Vakuum getrocknet, mehrere Male mit Wasser nachgewaschen und wiederum getrocknet, bis das Triäthylamin entfernt war.

Zur weiteren Bestimmung der Zusammensetzung dieser Oligonukleotide wurde entweder eine Spaltung mit 1 n KOH 15 Stunden bei 37° C vorgenommen, oder die durch T1-RNase erhaltenen Oligonukleotide wurden mit pankreatischer Ribonuklease (die durch pankreatische RNase erhaltenen Oligonukleotide mit T1-Ribonuklease) hydrolisiert. Die Spaltprodukte wurden auf 3 MM Papier aufgetragen und elektrophoretisch bei 3000 V drei Stunden lang im Trennpuffer für Nukleotide (pH 3,5) getrennt, dann getrocknet und eine Autoradiographie angefertigt.

B.8. Hydrolyse der 5S RNS-Protein-Komplexe

Die RNS-Protein-Komplexe wurden rekonstituiert, wie unter B.6.2. angegeben. Eine Enzymspaltung dieser Komplexe wurde sowohl mit T1-RNase als auch mit pankreatischer RNase vorgenommen. Das Enzym: Substrat-Verhältnis war 1 : 10 (g/g) und in einigen Fällen auch 1 : 5. Die Hydrolyse wurde bei 37° C für 20 Minuten durchgeführt. Nach der Enzymspaltung wurde das Hydrolysat zweimal mit Phenol (TR Puffer gesättigt) extrahiert. Die wässrigen Phasen wurden vereinigt und die darin enthaltene RNS durch Äthanolfällung bei -20° C über Nacht präzipitiert.

Die im Exsikkator unter Vakuum getrocknete RNS wurde entweder in TEB Puffer (Saccharose, Bromphenolblau) aufgenommen und auf einem 10 % Polyacrylamidgel getrennt oder in 8 M Harnstoff gelöst und auf einem Harnstoff-Polyacrylamidgel (12 %) getrennt. Nach der Autoradiographie wurden die einzelnen Banden von der Gelplatte herausgeschnitten. Auf gleiche Weise wie unter B.5.3. beschrieben, eluierte man die RNS-Fragmente aus dem Gel und bereitete sie für die weitere Charakterisierung durch die zweidimensionale Hochspannungselektrophorese vor.

C. Resultate

Die in dieser Arbeit untersuchten 5S RNS-Protein-Komplexe aus B. stearothermophilus 5S RNS mit B. stearothermophilus bzw. E. coli Proteinen und E. coli 5S RNS mit E. coli bzw. B. stearothermophilus Proteinen wurden mit verschiedenen Methoden nachgewiesen. Die einfachste Methode ist der Millipore-Filter Test. Auf diesem Filter wird der Komplex zurückgehalten, während die 5S RNS am Filter nicht gebunden wird. Man bestimmt die Bindung des Komplexes am Filter und kann gleichzeitig feststellen, wieviel % der eingesetzten ^{32}P 5S RNS in den RNS-Protein-Komplex enthalten sind.

Eine weitere Möglichkeit, den Komplex nachzuweisen, besteht darin, die unterschiedliche Ladung des Komplexes gegenüber der proteinfreien 5S RNS zu zeigen. Das wird auf einem Polyacrylamid-Platten-Gel dargestellt. Hier zeigt der Komplex eine kleinere Laufgeschwindigkeit als die 5S RNS. Um die verschiedenen Proteine der B. stearothermophilus- bzw. E. coli-Komplexe nachzuweisen, wurden die Komplexe mit größeren Mengen nicht-radioaktiver 5S RNS rekonstituiert und durch Gradientenzentrifugation isoliert (Horne und Erdmann 1972). Die Proteine dieser Komplexe wurden mit Essigsäure extrahiert und auf der zweidimensionalen Gelelektrophorese nach Kaltschmidt und Wittmann (1970) aufgetrennt. Die auf diese Art identifizierten Bindungsproteine der 5S RNS-Protein-Komplexe stimmten mit den von Horne und Erdmann (1972) veröffentlichten Ergebnissen überein.

Nach der enzymatischen Verdauung der 5S RNS-Protein-Komplexe und der 5S RNS unter gleichen Bedingungen wurden die Spaltprodukte auf einem Polyacrylamid-Platten-Gel getrennt. Wird die 5S RNS durch Proteine geschützt, dann ist sie für RNase weniger zugänglich. Hingegen wird eine durch Proteine nicht geschützte 5S RNS in sehr kleine Bruchstücke gespalten.
Die RNS-Fragmente des durch RNase gespaltenen Komplexes wurden mit Hilfe der 'Fingerprint' Methode weiter analysiert. Anschließend werden die durch Proteine geschützten Bereiche der 5S RNS-Sequenz bestimmt.

C.1. Bindung der Komplexe auf dem Millipore-Filter

In Tabelle 1 sind die verschiedenen RNS-Protein-Komplexe wiedergegeben, die mit der 5S RNS von B. stearothermophilus bzw. E. coli und den Proteinen aus beiden Organismen rekonstituiert wurden. Diese Bindungswerte sind Durchschnittswerte aus mehreren Präparationen. Der Filter (Nitozellulose) besitzt eine Affinität für RNS. Daher zeigt Tabelle 1 für die 5S RNS von B. sterothermophilus bzw. von E. coli einen Wert von 4 - 6 %. Dieser Blindwert wurde von den Bindungswerten der Komplexe abgezogen.
Der B. stearothermophilus 5S RNS-Protein-Komplex mit den B. stearothermophilus Proteinen zeigte den höchsten Wert. Dieser Befund stimmt auch mit den von Horne und Erdmann (1972) veröffentlichten Ergebnissen überein.

Die Bindungswerte der Komplexe mit der E. coli 5S RNS zeigten im allgemeinen niedrige Werte als sie im Komplex mit der B. stearothermophilus 5S RNS gefunden wurden.

5S RNS	Proteine	% Bindung von ^{32}P 5S RNS
B.st.	B.st.	50 - 55
B.st.	E.c.	40 - 50
E.c.	E.c.	35 - 38
E.c.	B.st.	34 - 38
B.st.	-	4 - 6
E.c.	-	4 - 6

Tabelle 1: Bindung der 5S RNS und der RNS-Protein-Komplexe am Millipore-Filter

C.2. (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex

C.2.1. Trennung der spezifischen RNS-Fragmente

Der RNS-Protein-Komplex wurde zunächst mit T1-RNase gespalten, die Proteine mit Phenol extrahiert und auf dem Polyacrylamid-Platten-Gel getrennt. Es zeigte sich, daß dieser Komplex unter 'milden' Enzymbedingungen (Enzym: Substrat-Verhältnis 1 : 50 bzw. 1 : 100) weder bei 0° C noch bei 37° C vollständig abgebaut wurde.

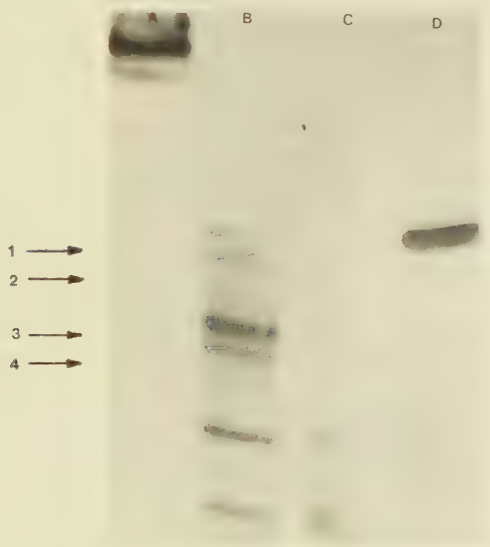


Abb. 5: Autoradiogramm einer 10 % Polyacrylamid-Platte.
A = (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex, B = A mit T1-RNase gespalten, C = 5S RNS mit T1-RNase gespalten und Enzymkonzentration in B und C 1 : 5. D = 5S RNS.
B und C wurden vor der Elektrophorese mit Phenol extrahiert.

Erhöhte man die Enzymkonzentration auf 1 : 10 bzw. 1 : 5, so erfolgte eine quantitative Spaltung der RNS des Komplexes zu definierten Fragmenten. Wie aus Abb. 5 zu entnehmen ist, wurde die durch Proteine geschützte 5S RNS in mehrere Bruchstücke gespalten, während in der 5S RNS Kontrolle (ohne Proteine) Fragmente gleicher Größe nicht zu erkennen sind.

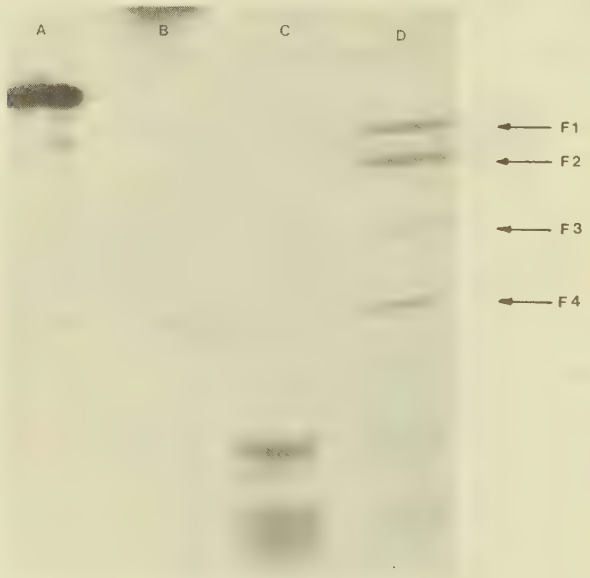


Abb. 6: Autoradiogramm einer Harnstoff-Polyacrylamid-Platte (12 %). A = 5S RNS, B = (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex, C = 5S RNS mit T1-RNase gespalten, D = B mit T1-RNase gespalten; Enzymkonzentration in C und D 1 : 5. C und D wurden vor der Elektrophorese mit Phenol extrahiert.

In einer Polyacrylamid-Platte ohne Harnstoff liegt die RNS nicht in ihrem entfalteten Zustand vor, so daß die Größe der RNS in diesem Gel nicht bestimmt werden kann. Daher wurden

1. die RNS Banden 1, 2, 3 und 4 aus Abb. 5 und
2. die enzymatisch gespaltenen RNS-Protein-Komplexe und die 5S RNS Kontrolle nach der Phenolextraktion der Proteine auf einer Harnstoff-Polyacrylamid-Platte (12 %) getrennt.

Die in Abb. 6 wiedergegebenen vier RNS Banden F1, F2, F3 und F4 waren identisch mit den aus dem 10 % Polyacrylamidgel erhaltenen und anschließend im Harnstoffgel getrennten RNS Banden 1, 2, 3 und 4.

Abb. 7 zeigt RNS Banden, die nach pankreatischer Spaltung des $(\text{B.st. 5S RNS})^{\text{B.st.Protein}}$-Komplexes erhalten wurden. Hier ist deutlich zu erkennen, wie resistent der Komplex gegen RNase Einwirkung im Gegensatz zur 5S RNS ist. Bei einer Enzymkonzentrationsreihe von 1 : 20, 1 : 10, 1 : 5 war die Intensität der Bande F1 verschieden stark, sie blieb aber immer erhalten, während die 5S RNS Kontrolle in sehr kleine Bruchstücke gespalten wurde.

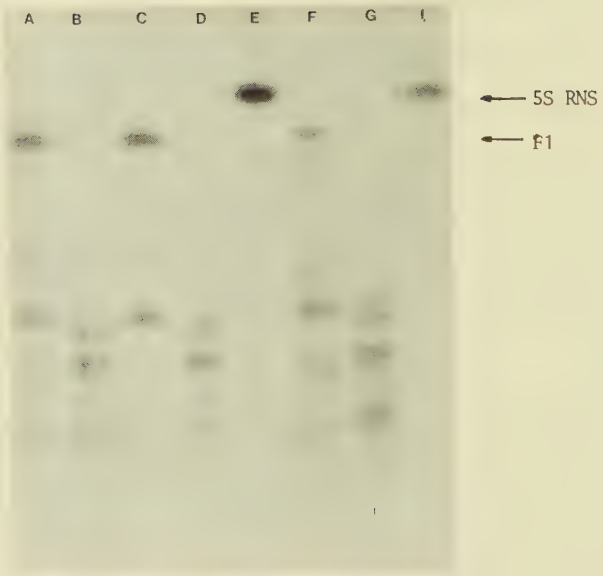


Abb. 7 Autoradiogramm einer Harnstoff-Polyacrylamid-Platte (12%)
A = (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex, mit pankreatischer RNase gespalten und B = 5S RNS mit pankreatischer RNase gespalten. Enzymkonzentration in A und B 1 : 10. C = A und D = B, Enzymkonzentration in C und D 1 : 20. E = 5S RNS F = A und G = B, Enzymkonzentration in F und G 1 : 5. I = 5S RNS.

Nach Isolierung der vorher beschriebenen Fragmente (T1-RNase Spaltung) wurden sie mit reinen, einzelnen E. coli Proteinen inkubiert und auf dem Millipore-Filter getestet. E-L18 band sehr stark an das Fragment F1, E-L25 etwas geringer und E-L5 sehr gering (siehe Tabelle 2). Als Kontrolle für eine unspezifische Bindung der RNS-Fragmente auf dem Filter wurde Serumalbumin benutzt; dieses Protein ergab nur eine geringe Bindung der Fragmente auf dem Filter. Die Bindung von E-L5 an das Fragment F2 war geringer als an F1, während E-L18 auch eine schwächere Bindung an F2 als an F1 zeigte. Für die Fragmente F3 und F4 wurde keine eindeutige Bindung mit den E. coli Proteinen gefunden.

Fragment	Proteine				Bindung (%)
	'AB'	L18	L25	L5	
F1	+	-	-	-	80 %
F1	-	+	-	-	66 %
F1	-	-	+	-	42 %
F1	-	-	-	+	12 %
F2	-	+	-	-	37 %
F2	-	-	+	-	10 %
F2	-	-	-	+	8 %
F3	-	+	-	-	13 %
F3	-	-	+	-	6 %
F3	-	-	-	+	5 %

Tabelle 2: Bindung der nach T1-RNase Spaltung erhaltenen Fragmente des $(B.st.\ 5S\ RNS)^{B.st.Protein}$-Komplexes mit den E. coli Proteinen L18, L25 und L5 am Millipore-Filter. 'AB' = Proteingemisch der B. stearothermophilus 50S Untereinheit.

C.2.2. Sequenz der 5S RNS von B. stearothermophilus

Bisher liegt nur eine vorläufige Sequenz der B. stearothermophilus 5S RNS vor (Marotta et al. 1973). Von diesen Autoren wurden keine Analysen der nach T1- bzw. pankreatischer RNase Spaltung erhaltenen 5S RNS-Stücke aufgeführt. Daher wurde zunächst die 5S RNS nach der Methode von Brownlee et al. (1968) mit T1- und pankreatischer RNase gespalten und die so erhaltenen 'Fingerprints' untersucht. Eine eindeutige Identifizierung der auf dem 'Fingerprint' dargestellten Nukleotide ist wichtig für die Analyse der in dieser Arbeit beschriebenen RNS-Fragmente, da die Oligonukleotidkarte der Fragmente mit der der 5S RNS verglichen wird.

Die auf dem 'Fingerprint' (Abb. 8a) sichtbaren 22 Flecken der mit T1-RNase gespaltenen 5S RNS wurden durch folgende Methoden analysiert:

1. Totalhydrolyse (KOH)
2. pankreatische Spaltung der T1-Oligonukleotide.

Diese Analysen ergaben die in Tabelle 3 angegebene Basenzusammensetzung der einzelnen Oligonukleotide. Aufgrund der vorläufigen Sequenz der 5S RNS von B. stearothermophilus wurde die theoretische Anzahl der nach 'T1'Spaltung zu erwartenden Oligonukleotide bestimmt und mit meinen Ergebnissen verglichen. Es wurde die Summe der Impulse in den einzelnen Flecken bestimmt und durch die Anzahl der in der 5S RNS Sequenz vorliegenden Nukleotide (119) dividiert. Auf diese Weise konnte die molare Anzahl der gefundenen Flecken mit der theoretisch erwarteten Ausbeute verglichen werden.

Fleck Nr.	Oligonukleotide	experimentell gefundene molare Anzahl der Ologonukleotide	theoretisch erwartete molare Anzahl der Oligonukleotide
T 1	G	16	8
T 2	CG	3,09	3
T 3	AG	3,38	4
T 4	CCG	1,36	1
T 5	AAG	1,09	1
T 6	CCAG	0,96	1
T 7	CAAG	0,92	1
T 8	UG	2,26	1
T 9	A_2CACG	0,77	1
T 10	UCG	1,29	1
T 12	A_3CAC_3G	0,67	1
T 13	AUG	1,69	2
T 14	UAG	1,24	1
T 15	CUAG	1,28	1
T 16	$_pCCUAG$	1,17	1
T 17	ACA_2UAG	0,76	1
T 18	C_4UG	0,99	1
T 19	UUG	1,04	2
T 20	U_2A_2G	0,89	1
T 21	$CUCUC_3AG$	0,91	1
T 22	$UCUC_2AC_3G$	1,14	1

Tabelle 3. Molare Anzahl der Oligonukleotide nach T1-RNase Spaltung von B. stearothermophilus 5S RNS.

Für T_8 (UG) und T_{19} (UUG) wurden Abweichungen festgestellt. Der theoretische Wert der molaren Ausbeute aus der vorläufigen Sequenz für T_{19} beträgt 2, experimentell wurde jedoch 1 gefunden (siehe Tab. 3). Umgekehrt war der theoretische Wert für T_8 1, experimentell jedoch 2. Da man bei den theoretischen Werten von einer vorläufigen Sequenz ausgeht, ist es nicht ausgeschlossen, daß T_{19} einmal bzw. T_8 zweimal innerhalb der Sequenz vorliegt.

C.2.3. Sequenz der Fragmente

Die RNS-Fragmente F1, F2, F3 und F4 wurden analog der 5S RNS untersucht, d.h. sie wurden mit T1-RNase gespalten und mit der 'Fingerprint' Methode analysiert. Der 'Fingerprint' der 5S RNS ist die Voraussetzung für die Analyse der gefundenen Fragmente. Er wird mit den 'Fingerprints' der einzelnen Fragmente verglichen. So erkennt man auf Abb. 8b (F1), daß im Gegensatz zu Abb. 8a (5S RNS) die Flecken T_7, T_{10}, T_{15}, T_{16}, T_{19} nicht vorhanden sind. Die Auswertung der restlichen Flecken (Tabelle 4) zeigt, daß T_2 und T_3 in einer molaren Anzahl von 2 vorliegen, während die restlichen Flecken mit einer molaren Anzahl von 1 bestimmt wurden.

Im kleineren Fragment F2 (Abb. 9a) fehlen neben den vorher genannten Flecken noch: T_4, T_6, T_8, T_{13}, T_{14}, T_{17}. Die molare Anzahl von T_{21} ist mit 0,54 etwas geringer als in Fragment F1. In der 5S RNS Sequenz erscheint es in einigen Analysen auch nur mit 0,77. T_{21} kann daher als vorhanden angenommen werden. T_{20} blieb am Start liegen, ist aber auf Abb. 9a deutlich zu sehen.

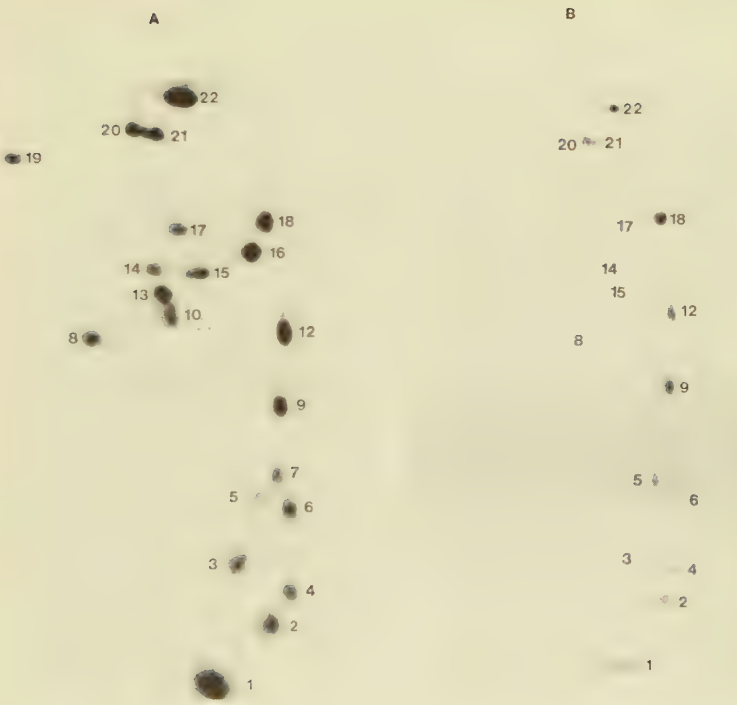


Abb. 8 T1-'Fingerprint' von B. stearothermophilus 5S RNS (A) und Fragment F1 (B). Elektrophorese: 1. Dimension im Harnstoff-Azetatsystem pH 3,5 und 2. Dimension in 7% Ameisensäure pH 1,9.

Abb. 9 T1-'Fingerprint' von Fragment F2 (A) und Fragment F3 (B). Elektrophoresebedingungen wie unter Abb. 8.

Fleck Nr.	Oligonukleotide	molare Anzahl der Oligonukleotide in den Fragmenten			
		F1	F2	F3	F4
T 1	G	9	8	7	5
T 2	CG	1,80	2,16	0,95	0,58
T 3	AG	1,65	1,76	0,79	0,48
T 4	CCG	0,94	-	-	-
T 5	AAG	1,10	1,35	0,93	-
T 6	CCAG	0,77	0,41	-	-
T 7	CAAG	-	-	-	-
T 8	UG	1,08	-	-	-
T 9	A_2CACG	0,85	0,73	0,95	-
T 10	UCG	-	-	-	-
T 12	A_3CAC_3G	0,81	0,58	-	-
T 13	AUG	0,73	-	-	-
T 14	UAG	0,75	-	-	-
T 15	CUAG	-	-	-	0,72
T 16	$_pCCUAG$	-	-	-	0,68
T 17	ACA_2UAG	0,75	-	-	-
T 18	C_4UG	1,25	0,94	1,10	1,0
T 19	UUG	-	-	-	-
T 20	U_2A_2G	0,93	0,51	0,57	-
T 21	$CUCUC_3AG$	0,65	0,54	-	-
T 22	$UCUC_2AC_3G$	1,04	1,40	0,86	-

Tabelle 4. Molare Anzahl der Oligonukleotide aus den verschiedenen T1-Fragmenten. Die Fragmente wurden nach T1-RNase Spaltung des (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplexes erhalten.

Das Fragment F3 besteht nach dem 'Fingerprint' nur noch aus 8 Oligonukleotiden. Wie aus Abb. 9 zu ersehen ist, fehlen gegenüber F2 die Flecken T_6 und T_{12}. Im Fragment F4, das auf Abb. 7 etwa in Höhe eines Fragmentes der 5S RNS Kontrolle zu sehen ist, findet man die 3' und 5' Endsequenzen der 5S RNS.

Die in der Tabelle 3 aufgeführten 22 Oligonukleotide der 5S RNS von B. stearothermophilus nehmen in der Sequenz eine bestimmte Position ein. Daher kann man z.B. von Oligonukleotid T_{12} (A_3CAC_3G) sagen, daß es in der Sequenz die Position von 24 - 32 besitzt (Abb. 15-2).

Im Fragment F1 fehlen 3 Oligonukleotide (T_{15}, T_{10} und T_{19}), die das 3'Ende der 5S RNS Sequenz bilden und ein Oligonukleotid (T_{16}), das dem 5'Ende zugeordnet wird (Abb. 13-1). Somit fehlt ein großer Bereich des 3' und 5'Endes der 5S RNS. Man kann daraus schließen, daß dieser wahrscheinlich basengepaarte Bereich der 5S RNS durch die B. stearothermophilus Proteine nicht geschützt wird. In der restlichen Sequenz erstreckt sich der durch Proteine geschützte Bereich von 6-15, wird unterbrochen an Position 16-18 und setzt sich fort von 19-80. Das UUG (T_{19}) an Position 80 der Sequenz ist nicht im geschützten Bereich enthalten. Ferner wird noch der Sequenzbereich von 83-98 durch die B. stearothermophilus Proteine geschützt. Das Fragment F2 beginnt in der Sequenz mit Position 19 und reicht bis 70. Die Sequenz 71-82 ist in diesem Fragment nicht enthalten, während die Position 83-98 weiterhin geschützt bleibt (Abb. 13-2).

Fragment F3 besteht nur aus zwei geschützten Bereichen, die von Position 33 bis 58 und 90 bis 98 vorliegen (Abb. 13-3).

Wird der (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex mit pankreatischer Ribonuklease verdaut, so wird hauptsächlich ein Fragment (F1) gefunden (Abb. 7). Sequenzanalysen zeigten, daß dieses Fragment die gleichen Sequenzbereiche erfaßt, wie das vorher beschriebene Fragment F1 aus T1-RNase Spaltung.

C.3. (B.st. 5S RNS)$^{E.c.Protein}$-Komplex

C.3.1. Trennung der spezifischen RNS-Fragmente

Nach einer T1-RNase Spaltung des (B.st. 5S RNS)$^{E.c.Protein}$-Komplexes erhielt man wiederum vier RNS-Fragmente. Diese Fragmente verhielten sich in der Gelelektrophorese ähnlich wie die aus dem (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex erhaltenen Fragmente.

C.3.2. Sequenz der Fragmente

In Tabelle 5 erkennt man, daß Fragment F1 in der Anzahl und Art der Oligonukleotide mit F1 aus dem (5S RNS -B.st.)$^{B.st.Protein}$-Komplex übereinstimmt. Auch die molare Anzahl der gefundenen Oligonukleotide kann man mit dem vorher genannten Fragment vergleichen. T_7 war in F1 (Tabelle 5) in einer molaren Anzahl von 0,51 aufgetreten, während es in dem durch B. stearothermophilus Proteinen geschützten Fragment nicht vorhanden war.

Fleck Nr.	Oligonukleotide	molare Anzahl der Oligonukleotide in den Fragmenten			
		F1	F2	F3	F4
T 1	G	9	9	8	6
T 2	CG	2,2	2,3	0,82	0,98
T 3	AG	0,78	0,87	0,78	1,02
T 4	CCG	1,21	1,68	-	-
T 5	AAG	0,76	0,82	-	-
T 6	CCAG	1,27	0,83	-	-
T 7	CAAG	0,51	-	-	-
T 8	UG	1,40	0,42	-	-
T 9	A_2CACG	0,78	0,79	1,10	1.10
T 10	UCG	-	-	-	-
T 12	A_3CAC_3G	0,71	0,67	-	-
T 13	AUG	0,79	-	-	0,81
T 14	UAG	0,98	-	-	1,02
T 15	CUAG	-	-	-	0,69
T 16	$pCCUAG$	-	-	-	0,76
T 17	ACA_2UAG	0,78	-	-	-
T 18	C_4UG	1,0	1,10	1,08	1,04
T 19	UUG	-	-	-	-
T 20	U_2A_2G	0,68	0,67	-	-
T 21	$CUCUC_3AG$	0,69	0,80	-	-
T222	$UCUC_2AC_3G$	1,10	1,04	0,82	-

Tabelle 5. Molare Anzahl der Oligonukleotide aus den verschiedenen T1-Fragmenten. Die Fragmente wurden nach T1-RNase Spaltung des $(B.st.\ 5S\ RNS)^{E.c.Protein}$-Komplexes erhalten.

Die kleineren Fragmente F2 und F3 ergaben in der Sequenz ähnliche Bereiche, wie sie im Komplex mit B. stearothermophilus Proteinen erhalten wurden. F4, das nicht als ein durch Proteine geschütztes Fragment anzusehen ist, denn es ist auf dem Platten-Gel in Höhe eines Fragmentes der 5S RNS Kontrolle zu sehen, enthielt wiederum Teile des 3' und 5'Endes der 5S RNS.

Das nach pankreatischer RNase Spaltung erhaltene Fragment ergab in der 'Fingerprint' Analyse ähnliche Ergebnisse wie die im entsprechenden Fragment aus dem (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex gefundenen.

Die durch die E. coli Proteine geschützten Bereiche in der B. stearothermophilus 5S RNS Sequenz erstrecken sich in F1 von 6-20, mit einer Unterbrechnung von drei Nukleotiden, weiterhin von 21-80 und 83-103.
Das Fragment F2 enthält die 5S RNS Sequenzbereiche 23-72 sowie 83-103, während das Fragment F3 die Bereiche 33-50 und 90-98 aufweist (Tabelle 5).

C.4. (E.c. 5S RNS)$^{E.c.Protein}$-Komplex

C.4.1. Trennung der spezifischen RNS-Fragmente

Der (E.c. 5S RNS)$^{E.c.Protein}$-Komplex scheint gegenüber dem (B.st. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplex weniger stabil zu sein. Unter gleichen Enzymbedingungen (1 : 10) wurde er ähnlich der 5S RNS Kontrolle

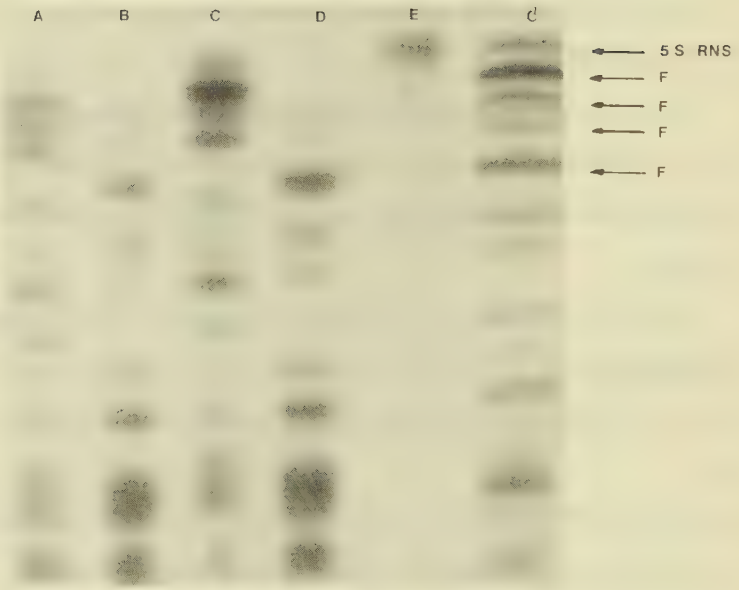


Abb. 10 Autoradiogramm einer Harnstoff-Polyacrylamid-Platte (12%)

A = (E.c. 5S RNS)$^{\text{E.c.Protein}}$-Komplex, mit T1-RNase gespalten

B = 5S RNS, mit T1-RNase gespalten, Enzymkonzentration 1 : 20.

C = A und D = B, Enzymkonzentration in C und D 1 : 25.

C' = C nach besserer Auftrennung. E = 5S RNS

(ohne Proteine) in kleine RNS Bruchstücke gespalten (Abb. 10). Bei einem Verhältnis von 1 : 25 wurden RNS Banden sichtbar, wie sie auf dem Autoradiogramm (Abb. 10, C') zu sehen sind. Die Bande 1 lief auf gleicher Höhe wie die ungespaltene 5S RNS und zeigte nach T1 RNase Spaltung im 'Fingerprint' alle charakteristischen 5S RNS Flekken. Die Banden 2, 3 und 4 werden als Fragmente F1, F2, F3 bezeichnet, da in der 5S RNS Kontrolle (ohne Proteine) RNS Banden in gleicher Höhe auf dem Gel nicht zu sehen sind. F1 ist auf dem Autoradiogramm wesentlich stärker zu sehen als die Bande 1 (5S RNS). Bei einer höheren Enzymkonzentration (z.B. 1 : 20) verschwindet Bande 1, und die restlichen Banden bleiben erhalten.

C.4.2. Sequenzanalyse der Fragmente

In Abb. 11 b sieht man das entsprechende 'Fingerprint' Bild des RNS Fragmentes F1. Hier fehlen die Oligonukleotide T_9, T_{17}, T_{18}. Wiederum wurde das 3' und 5'Ende der 5S RNS durch die Proteine nicht geschützt. T_{17} war in der untersuchten 5S RNS Sequenz nicht vorhanden. Anstelle CCUUAG enthielt die RNS die Oligonukleotide CCG und UAG. Daher wurde die theoretische molare Anzahl von T_5 (CCG) und von T_{10} (UAG) mit jeweils 4 gefunden.
Tabelle 6 gibt eine Zusammenfassung der in den Fragmenten vorhandenen Oligonukleotide und deren molare Anzahl wieder. Während im Fragment F1 die experimentell gefundenen Werte für die molare Anzahl gut mit der veröffentlichten Sequenz übereinstimmten, gab es im Frag-

Abb. 11 T1-'Fingerprint' von E. coli 5S RNS (A) und Fragment F1 (B). Elektrophoresebedingungen wie unter Abb. 8.

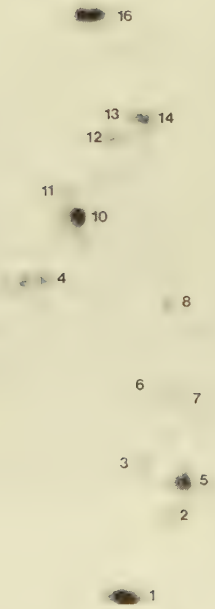


Abb. 12 T1-'Fingerprint' von Fragment F2. Elektrophoresebedingungen wie unter Abb. 8.

Fleck Nr.	Oligonukleotide	molare Anzahl der Oligonukleotide in 5S RNS	den Fragmenten F1	F2	F3
T 1	G	10	8	7	5
T 2	CG	4	2,80	2,10	2,28
T 3	AG	2	1,78	1,59	0,31
T 4	UG	4	2,90	1,68	2,10
T 5	CCG	4	3,10	2,40	1,78
T 6	AAG	1	0,68	0,48	0,33
T 7	CCAG	1	1,07	0,79	-
T 8	A_3CG	1	0,78	0,57	0,78
T 9	C_2UG	1	-	-	-
T 10	UAG	4	2,30	1,56	1,78
T 11	AUG	1	0,78	0,78	0,67
T 12	A_2CUG	1	0,64	0,67	-
T 13	A_2CUCAG	1	0,65	0,25	-
T 14	AC_4AUG	1	0,72	o,32	-
T 15	UC_3AC_2UG	1	0,79	-	-
T 16	UC_2UC_4AUG	1	0,85	0,98	0,58
T 18	p^{UG}	1	-	-	-
T 17^x					

Tabelle 6. Molare Anzahl der Oligonukleotide der E. coli 5S RNS und der verschiedenen T1-Fragmente. Die Fragmente wurden nach T1-RNase Spaltung des (E.c. 5S RNS)$^{E.c.Protein}$-Komplexes erhalten. ^{x}T 17 nicht vorhanden (Erklärung siehe Text)

ment F2 einige Flecken mit geringerer molarer Anzahl, z.B. T_{13} = 0,25 und T_{14} = 0,31. Es ist daher anzunehmen, daß T_{13} und T_{14} nicht in dem Fragment F2 vorhanden sind. Obgleich T_8 (0,57) in geringeren Mengen in den Fragmenten F1, F3 gefunden wurde, ist es wahrscheinlich, daß T_8 im Fragment F2 auftritt.

T_6 im Fragment F2 (0,48) zeigt eine verringerte molare Anzahl, dessen Wert in F3 auf 0,33 zurückgeht. Dieser Fleck ist wahrscheinlich in F2 noch vorhanden, während er in F3 nicht mehr auftritt. Ferner fehlen im Fragment F3 noch die Flecken: T_3, T_7, T_{12}, T_{13}, T_{14} und T_{15}.
Die Auswertung des 'Fingerprints' des Fragmentes F1 zeigt, daß von Position 24-103 und 108-116 die E. coli 5S RNS Sequenz durch E. coli Proteine geschützt wird. Die zwei kleineren Fragmente F2 und F3 setzen sich aus den Sequenzbereichen 57-103 und 108-116 sowie 55-86 zusammen.

Vorläufige Ergebnisse mit pankreatischer RNase zeigten, daß der $(E.c.\ 5S\ RNS)^{E.c.Protein}$-Komplex in ein Fragment gespalten wird, das eine ähnliche Sequenz wie das T1-Fragment F1 aufweist.

C.5. $(E.c.\ 5S\ RNS)^{B.st.Protein}$-Komplex

C.5.1. Trennung der spezifischen RNS-Fragmente

Nach einer T1-RNase Spaltung dieses Komplexes (Enzym: Substrat-Verhältnis 1 : 20) waren noch Spuren von 5S RNS und weitere drei charakteristische Banden sichtbar. In der Kontrolle, d.h. 5S RNS, konnte man keine vergleichbaren Banden auf dem Harnstoff-Polyacrylamid-

Fleck Nr.	Oligonukleotide	molare Anzahl der Oligonukleotide in 5S RNS	den Fragmenten F1	F2	F3	F4
T 1	G	10	9	7	6	5
T 2	CG	4	1,78	2,90	3,10	1,10
T 3	AG	2	0,89	0,25	0,40	-
T 4	UG	4	1,58	3,10	3,20	3,10
T 5	CCG	4	2,59	2,81	3,10	1,01
T 6	AAG	1	0,23	0,31	0,34	-
T 7	CCAG	1	0,58	-	-	-
T 8	A_3UG	1	0,56	0,76	0,81	0,78
T 9	C_2UG	1	-	-	-	-
T 10	UAG	4	1,54	1,87	1,91	1,92
T 11	AUG	1	0,75	0,78	1,0	0,76
T 12	A_2CUG	1	-	-	-	-
T 13	A_2CUCAG	1	0,58	0,58	0,68	0,76
T 14	AC_4AUG	1	0,57	0,62	0,57	0,79
T 15	UC_3AC_2UG	1	0,96	0,89	0,96	0,98
T 16	$UCCUC_4AUG$	1	0,68	0,68	-	0,67
T 18	pUG	1	-	-	-	1,18

Tabelle 7. Molare Anzahl der Oligonukletide der E. coli 5S RNS und der verschiedenen T1-Fragmente. Die Fragmente wurden nach T1-RNase Spaltung des (E.c. 5S RNS)$^{B.st.Protein}$-Komplexes erhalten. ^{x} T 18 nicht vorhanden (Erklärung siehe Text)

Platten (12 %) feststellen. Wurde die Enzymkonzentration auf 1 : 10 erhöht, so war die 5S RNS Bande nicht mehr sichtbar, aber die restlichen drei Banden blieben erhalten. Diese drei Fragmente wurden mit der 'Fingerprint' Methode untersucht.

C.5.2. Sequenz der Fragmente

Im Fragment F1 fehlen die Oligonukleotide T_6, T_9, T_{12} und T_{18}. Wiederum sind die 3' und 5'Enden der 5S RNS in den durch B. stearothermophilus Proteine geschützten Regionen nicht enthalten. Die molare Anzahl von T_7 und T_8 ist verhältnismäßig gering (Tabelle 7). Da in diesem Fragment aber alle molaren Werte im Gegensatz zu den entsprechenden Werten der 5S RNS geringer ausgefallen sind, kann man diese beiden Oligonukleotide als vorhanden ansehen.
In Fragment F2 fehlen die Flecken T_3 und T_7, während in F3 außerdem noch T_{16} fehlt. Im Fragment F4 treten neben den in F3 enthaltenen Oligonukleotiden auch noch T_{18} und T_9 auf, die das 5'Ende der Sequenz bilden. Dieses Fragment erscheint auf dem Platten-Gel in einer Region, in der auch in der 5S RNS Kontrolle eine Bande sichtbar ist.
Die Auswertung des T1-Fragmentes F1 zeigt, daß die durch Proteine geschützten Bereiche von 24-51, 57-103 und 113-116 zu finden sind. Das nach pankreatischer Spaltung dieses Komplexes erhaltene Fragment zeigte ähnliche Ergebnisse wie das vorher erwähnte T1-Fragment F1. Im kleineren Fragment F2 ist der Bereich von 24-51 und 55-98 geschützt, während die Bereiche 24-51 und 55-86 im Fragment F3 erhalten blieben.

D. Diskussion

D.1. Zur Ribonukleaseverdauung der Komplexe

Die in dieser Arbeit untersuchten 5S RNS-Protein-Komplexe wurden nach speziellen, in diesem Labor entwickelten Rekonstitutionsbedingungen dargestellt, um optimale Stabilität der Komplexe zu erreichen. Die Homogenität der unter diesen Pufferbedingungen rekonstituierten Komplexe ist die Voraussetzung, um bei der im gleichen Puffer durchgeführten Ribonukleasespaltung der Partikel reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten. Um möglichst physiologische Bedingungen einzuhalten, wurden die Partialhydrolysen bei 37°C vorgenommen, außerdem erreicht die Enzymaktivität hier ein Maximum.
Nach der enzymatischen Spaltung der Komplexe wurden wesentlich größere RNS-Fragmente erhalten als nach der Hydrolyse der proteinfreien 5S RNS unter gleichen Bedingungen. Man setzt voraus, daß diese Bruchstücke durch gebundene Proteine vor weiterer Verdauung geschützt sind. Ob die bei der Bindung der Proteine denkbare Änderung der Raumstruktur der RNS Einfluß auf die Wirkungsspezifität der Nuklease besitzt, kann nicht entschieden werden. Erwähnenswert ist weiter, daß aus verschiedenen Ribosomenpräparationen stammende Komplexe stets gleiche Spaltprodukte lieferten; d.h. daß die Ergebnisse völlig reproduzierbar sind.
In den Abbildungen 13 und 14 sind schematisch die beiden 5S RNS Moleküle mit zwei als basengepaart geltenden Bezirken (siehe auch Abb. 15 Region A und E) und den vor RNase geschützten Bereichen dargestellt. Tabelle 8 gibt die dazugehörigen Bindungsproteine aus Ribosomen von E. coli und B. stearothermophilus nach den

Befunden von Horne und Erdmann (1972) an.

5S RNS	Proteine	
	B.st. Proteine	E.c. Proteine
B.st. 5S RNS	B-L5[x], B-L22[x]	E-L5, E-L18, E-L25
E.c. 5S RNS	B-L5, B-L22	E-L5, E-L18, E-L25

[x]Nach Horne und Erdmann (1972) entsprechen die B. stearothermophilus Proteine B-L5 und B-L22 den E. coli Proteinen E-L5 und E-L18.

Tabelle 8. Bindungsproteine von homologen und heterologen RNS-Protein-Komplexen (nach Horne und Erdmann 1972).

D.2. Protein-Komplex mit B. stearothermophilus 5S RNS

D.2.1. T1-Fragmente F1

Abb. 13-1 zeigt einen durch die B. stearothermophilus Proteine geschützten Sequenzbereich von 6-98. Durch die E. coli Proteine (Abb. 13-2) wird ein ähnlicher Bereich, 6-103, geschützt. Beide Fragmente sind wahrscheinlich an Position 16-18 und 80-82 unterbrochen; dies kann zur Zeit nicht genau festgelegt werden, da z.B. die Anzahl der Dinukleotide AG im Bereich 16-22 nicht eindeutig geklärt ist. Wärend in der 5S RNS das 5'Ende mit dem 3'Ende wahrscheinlich basengepaart ist, enthält F1 in beiden Fragmenten nur einen Teil des

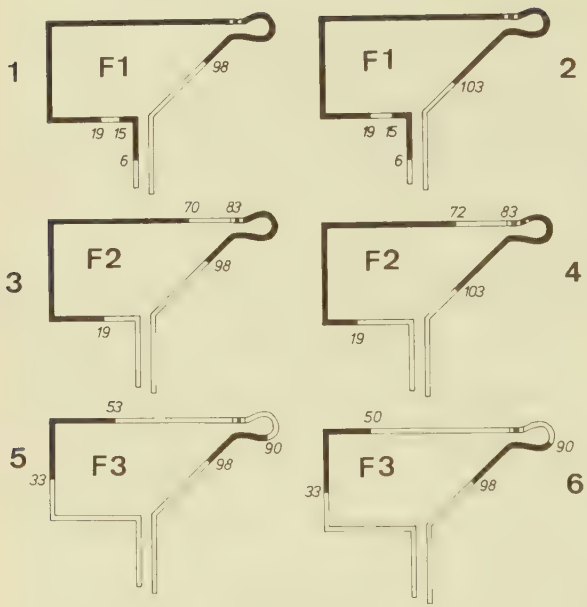


Abb. 13 Geschützte Sequenzbereiche (▬) der B. stearothermophilus 5s RNS durch B. st. Proteine (links) und E. c. Proteine (rechts).

5'Endes (6-15). Dieser Befund deutet darauf hin, daß durch die Wechselwirkung der 5S RNS mit den Bindungsproteinen im basengepaarten Bereich A der 5S RNS eine Konformationsänderung eintritt (Abb. 15-2).Da drei E. coli Proteine (E-L5, E-L18 und E-L25) , aber nur zwei B. stearothermophilus Proteine (B-L5 und B-L22)an die 5S RNS binden, ist es, wie aus dem Vergleich der Abb 13-1 und Abb 13-2 hervorgeht, wahrscheinlich, daß E-L25 den Bereich 98-103 schützt.

D.2.2. T1-Fragment F2

In Abb. 13-3 und 13-4 beginnt der geschützte Sequenzbereich mit Position 19. Die in Abb. 13-1 und 13-2 aufgetretenen Teile des 5'Endes der 5S RNS Sequenz wurden abgebaut. Unterbrechungen findet man in beiden Fragmenten um Position 80.Abb. 13-4 zeigt weiterhin noch den in Abb. 13-2 geschützten Bereich 98-103, der wahrscheinlich mit E-L25 in Wechselwirkung treten wird.

D.2.3. T1-Fragment F3

Im Fragment F3 schützen die B. stearothermophilus Proteine die Regionen 33-53 und 90-98 (Abb. 13-5), die E. coli Proteine die Bereiche 33-50 und 90-98; d.h. mit Ausnahme der Nukleotide 51-53 wird der Abbau durch RNase in beiden Fällen in identischen Sequenzbereichen verhindert.

D.3. Protein-Komplexe mit E. coli 5S RNS

Während für die B. stearothermophilus 5S RNS nur B-L5 und B-L22 als Bindungsproteine nachgewiesen sind, wurden für die E. coli 5S RNS drei Bindungsproteine ermittelt (E-L5, E-L18 und E-L25), von denen E-L5 relativ schwach bindet. Die beiden B. stearothermophilus Proteine gehen eine relativ starke Wechselwirkung mit der E. coli 5S RNS ein (Horne und Erdmann 1972). Die nachfolgend aufgeführten Ergebnisse, die nach einer Spaltung von E coli 5S RNS-Protein-Komplexen mit T1-RNase erhalten wurden, unterstützen diesen Befund.

D.3.1. T1-Fragmente F1

Wenn die E. coli Proteine gebunden sind, ist ein Sequenzbereich von 24-116 geschützt (Abb. 14-1). In diesem Bereich findet man nur eine Unterbrechung von 103-108. Die B. stearothermophilus Proteine schützen im Fragment F1 (Abb. 14-2) einen Bereich von 24-103 mit einer Unterbrechung an Position 51-57. Der Sequenzbereich 113-116 in diesem Fragment ist nur teilweise geschützt.
Da die B. stearothermophilus Proteine B-L5 und B-L22 den Bereich von 24-103 (Abb. 14-2) und die drei E. coli Proteine E-L5, E-L18 und E-L25 die Region 24-116 (Abb. 14-1) schützen, ist der Schutz in dem Bereich 108-116 wahrscheinlich auf die Bindung von E-L25 zurückzuführen. Dieser Sequenzbereich 108-116 ist wiederum ein Teil des basengepaarten Bereiches A der 5S RNS (Abb. 15-1). Da die komplementäre Sequenz zu Position 108-116 in F1 nicht vorhanden ist, muß man annehmen, daß im basengepaarten Bereich A der 5S RNS nach Bindung der Proteine an

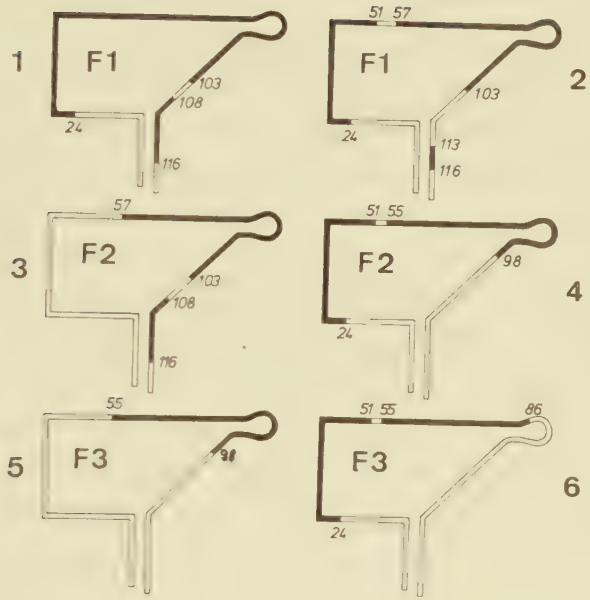


Abb. 14 Geschützte Sequenzbereiche (—) der E. coli 5S RNS durch E.c. Proteine (links) und B.st. Proteine (rechts).

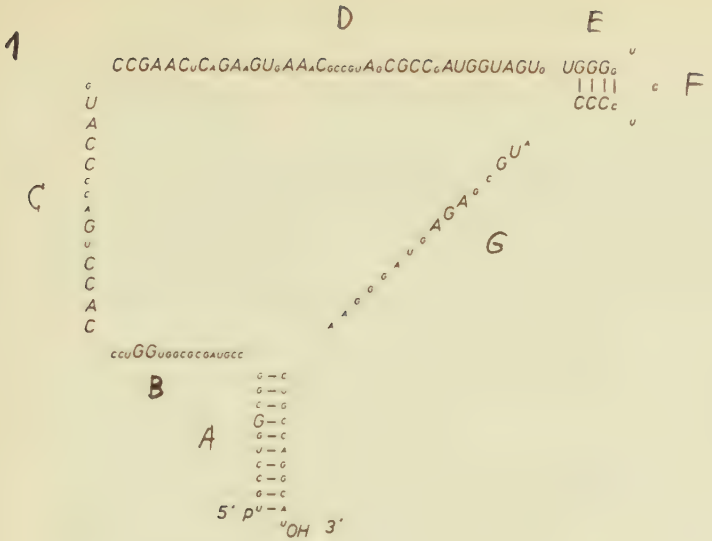
die RNS eine Konformationsänderung eintritt.

D.3.2. T1-Fragmente F2

Das Fragment F2 in Abb.14-3 umfaßt einen geschützten Sequenzbereich von 57-116. Im Gegensatz zu Abb. 14-1 wird in F2 (Abb. 14-3) der Bereich 24-57 abgebaut. Abb. 14-4 zeigt ähnlich geschützte Sequenzbereiche 24-98 wie in Abb14-2. Da die B. stearothermophilus Proteine B-L5 und B-L22 stark an E. coli 5 RNS binden (Horne und Erdmann), umfaßt die Bindung dieser Proteine den Bereich 24-98 (Abb. 14-%). Von den E. coli Proteinen ist bekannt, daß E-L18 und E-L25 stark und E-L5 schwach an die 5S RNS binden. Daher ist das von E-L5 geschützte RNS-Fragment als erstes RNase empfindlich. Dies ist der Bereich 24-51, der in F2 (Abb. 14-3) nicht mehr enthalten ist. Dieser Schluß wird dadurch unterstützt, daß der Bereich 24-51 noch geschützt bleibt, wenn das B. stearothermophilus Protein B-L5 (+ B-L22) gebunden ist (Abb. 14-4).

D.3.3. T1-Fragmente F3

Die E. coli Proteine schützen in F3 den Bereich 55-98 (Abb. 14-5) und die B. stearothermophilus Proteine einen Bereich von 24-86 (Abb. 14-6). Da beide Fragmente die Sequenz 55-86 enthalten, ist es wahrscheinlich, daß dieser Bereich durch E-L18 bzw. B-L22 geschützt wird. Denn nur die B. stearothermophilus Proteine schützen den Bereich 24-51 (Abb. 14-6), der möglicherweise mit dem Protein B-L5 in Wechselwirkung tritt.



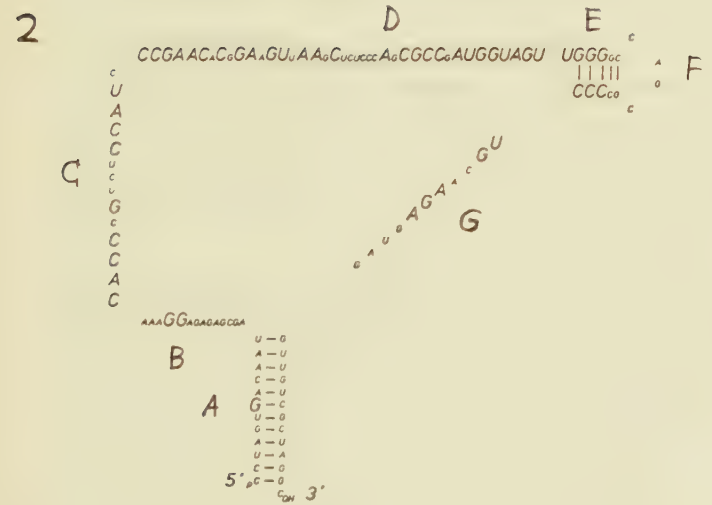


Abb. 15 5S RNS Sequenz von E. coli (1) und b. stearothermophilus (2). Große Buchstaben in der Sequenz kennzeichnen die Homologien beider 5S RNS-Arten.

D.4. Vergleiche zwischen 5S RNS-Protein-Komplexen

Die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, daß die 5S RNS Bindungsproteine aus E. coli und B. stearothermophilus in beiden 5S RNS-Arten mit ähnlichen Bereichen in Wechselwirkung treten. Die für die Bindung der Proteine wichtigen Bereiche erstrecken sich ungefähr von 20-100. Sie enthalten Regionen der 5S RNS, die während der Evolution erhalten blieben (Erdmann 1975), wie auf Abb. 15 zu sehen ist.

In früheren Rekonstitutionsversuchen wurde gezeigt, daß alle prokaryontischen 5S RNS-Arten in B. stearothermophilus 50S Untereinheiten zu aktiven Partikeln eingebaut werden konnten (Wrede und Erdmann 1973). Daher war zu erwarten, daß die Regionen der 5S RNS, die für die Wechselwirkung mit den Proteinen wichtig sind, konserviert wurden. Diese Hypothese wird durch die hier beschriebenen Ergebnisse bestätigt. Vergleicht man die verschiedenen Proteine aus E. coli und B. stearothermophilus mit den gschützten Regionen der E. coli und B. stearothermophilus 5S RNS, so deutet sich an, daß die Proteine L5, L18 und L25 primär mit den Regionen 30-50, 50-90 und 90-103 in Wechselwirkung treten. Es ist möglich, daß L25 erst mit L18 in Wechselwirkung tritt, bevor es an den Sequenzbereich 90-103 bindet.

Die Vergleichsstudien zeigen ferner, daß der in der 5S RNS wahrscheinlich basengepaarte Bereich A (Abb. 15) durch die Wechselwirkung mit den Proteinen aufgetrennt wird. Sollte sich diese Annahme weiter bestätigen lassen, so wäre zum ersten Male gezeigt worden, daß doppelsträngige Bereiche durch ribosomale Proteine aufgetrennt werden können.

E. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene 5S RNS-Protein-Komplexe von E. coli und B. stearothermophilus untersucht. Diese Komplexe eignen sich besonders dazu, die RNS-Protein Wechselwirkung zu erforschen. Eine Voraussetzung dieser Vergleichsstudien war die Kenntnis der Sequenz beider 5S Ribonukleinsäuren.
^{32}P markierte 5S RNS beider Organismen wurde mit E. coli und B. stearothermophilus Proteinen rekonstituiert, mit RNase gespalten und die so entstehenden RNS-Fragmente auf einer Platten-Gel-Elektrophorese getrennt. Unterschiedlich große RNS-Fragmente zeigten, daß das Auftreten größerer Bruchstücke der RNS durch die Bindungsproteine verursacht sein mußte, da die 5S RNS Kontrolle (ohne Proteine) immer zu kleineren Fragmenten abgebaut wurde. In allen vier beschriebenen Komplexen konnten fast gleich große spezifische Fragmente nachgewiesen werden. Diese wurden mit Hilfe der 'Fingerprint' Methode analysiert, und auf diese Art konnten die geschützten Sequenzbereiche bestimmt werden. Es sind dies gerade die Bereiche, die in allen prokaryontischen 5S RNS-Arten ähnlich sind.
Ddurch, daß die homologen E. coli und B. stearothermophilus 5S RNS-Protein-Komplexe verschiedene Bindungsproteine besitzen, war es möglich, die Bindungsstellen an der 5S RNS für beide Organismen zu bestimmen. Diese Untersuchungen zeigten, daß E. coli und B. stearothermophilus Proteine in der gleichen 5S RNS ähnliche Sequenzbereiche vor Verdauung mit RNase schützen.
Eine Zusammenfassung aller vorliegenden RNS-Protein Bindungsdaten aus den vier untersuchten Komplexen zeigt, daß als hauptsächliche

Bindungsstelle für das Protein E-L5 die Region 33-51, und für das Protein E-L18 die Region 52-86 angegeben werden können. Die Bindungsstelle von E-L25 läßt sich nicht so genau characterisieren, da dessen Bindung unter Umständen davon abhängig ist, daß E-L18 vorher an die 5S RNS gbunden hat. E-L25 schützt die Position um 100 in beiden Ribonukleinsäuren, obgleich die Sequenzen in diesem Bereich stark variieren. Daher ist es möglich, daß E-L25 zunächst mit E-L18 in Wechselwirkung tritt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen die Hypothese, daß die Bereiche der 5S RNS, die mit den Proteinen in Wechselwirkung treten, während der Evolution erhalten blieben.

F. Literaturverzeichnis

Araco, A., Belli, M., Giorgi, C. and Onori, G.: The secondery structure of E. coli ribosomes and ribosomal RNS's: a spectophotometric approach. Nucleic Acid Research 2, 373-381 (1975)

Bellemare, G., Jordan, B.R., Rocca-Serra, J. and Monier, R.: Accessibility of Escherichia coli 5S RNA base residues to chemical reagents. Influence of chemical alterations on the affinity of 5S RNS for the 50S subunit structure. Biochemie 54, 1453-1462 (1972)

Bellemare, G., Vigne, R. and Jordan, B.R.: Interaction between Escherichia coli ribosomal proteins and 5S RNSs molecules: recognition of procaryotic 5S RNSs and rejection of eucaryotic 5S RNSs. Biochemie 55, 29-35 (1973)

Boetdker, H. and Kelling, D.: The ordered structure of 5S RNS. Biochem. Biophys. Res. Com. 29, 758-766 (1967)

Brownlee, G.G., Sanger, F. and Barrel, B.G.: The sequence of 5S ribonucleic acid. J. Mol. Biol. 34, 379-412 (1968)

Brownlee, G.G., Cartwright, E., McShane, T. and Williamson, R.: The nucleotide sequence of somatic 5S RNA from Xenopus laevis. FEBS Letters 25, 8-12 (1972)

Cantor, C.R.: Possible conformation of 5S rRNA. Nature 216, 513-514 (1967)

Cramer, F. and Erdmann,V.A.: Amount of adenine and uracil base pairs in E. coli 23S, 16S and 5S ribosomal RNA. Nature 218, 92 (1968)

Delihas, N. and Erdmann, V.A.: The reaction of 5S RNA in 70S ribosome with kethoxal. Biochem. Biophys. Res. Comm. in press (9175)

DuBuy, B. and Weissman, S.M.: Nucleotide sequence of Pseudomonas fluorescens 5S ribonucleic acid. J. Biol. Chem. 246, 747-761 (1971)

Eikenberry, E., Bickle, T., Traut,R. and Price, C.: Separation of large quantities of ribosomal subunits by zonal ultracentrifugation. Eur. J. Biochem. 12, 113-116 (1970)

Erdmann, V.A., Fahnestock, S. and Nomura, M.: Reconstitution of 50S ribosomes from 23S and 5S RNA and protein components. Fed. Proc. 30, 1203 (1971)

Erdmann, V.A., Sprinzl, M. and Pongs, O.: The involvement of 5S RNA in the binding of t-RNA to ribosomes. Biochem. Biophys. Res. Comm. 54, 942-948 (1973)

Erdmann, V.A.: 5S RNA, in 'Progress in Nucleic Reseach and Molecular Biologie' Edt. Cohen, W. Academic Press, N. Y. (1975) in press

Fellner, P. and Ebel,J.: The primary structure of high molecular weight ribosomal RNA. Abstr. Cold Spring Harbor Symp. Sept. 1973

Forget, B.G. and Weissman, S.M.: Nucleotide sequence of KB cell 5S RNA. Science 158, 1695-1699 (1967)

Gaunt-Klöpfer, M. and Erdmann, V.A.: ATPase and GTPase activities associated with the 5S RNS-protein complex of Escherichia coli ribosomes. Biochem. et Biophys. Acta 390, 226-230 (1975)

Gray, P., Bellemare, G., Monier,R., Garrett,R. and Stöffler, G.: Identification of the nucleotide sequence involved in the interaction between E. coli 5S RNA and specific 50S subunit proteins. J. Mol. Biol. 77, 133-152 (1973)

Grummt, F., Grummt, I. Gross, H.J., Sprinzl,M., Richter,D. and Erdmann,V.A.: Effects of TYCG on the enzymatic binding of eucaryotic and procaryotic initiator t-RNAs to rat liver ribosomes. FEBS 42, 15-17 (1974)

Hall, C. and Slayter, H.: Electron microscopy of ribonucleoprotein particles from E. coli. J. Mol. Biol. 1, 329-332 (1959)

Horne, J.R. and Erdmann,V.A.: Isolation and characterisation of 5S RNA-protein-complexes from Bacillus stearothermophilus and Escherichia coli ribosomes. Mol. gen. Gent. 119, 337-344 (1972)

Horne, J.R. and Erdmann, V.A.: ATPase and GTPase activities associated with a specific 5S RNA-protien-complex. Proc. Nat. Acad. Sci. (US) 70, 2870-2873 (1973)

Jordan, B.R.: Studies on 5S RNA conformation by ribonuclease hydrolysis. J. Mol. Biol. 55, 423-439 (1971)

Klatschmidt, E. and Wittmann, H.G.: Ribosomal protein.VII Two-dimentional polyacrylamide gel electrophoresis for finger-printing of ribosomal proteins. Anal. Biochem. 36, 401-412 (1970)

Kearns, D.R. and Wong, Y.P.: Invstigation of the secondery structure of Escherichia coli 5S RNA by high resolution nuclear magnetic resonance. J. Mol. Biol. 87, 755-774 (1974)

Litt, M.: Kethoxal as a chemical probe for the conformation of 5S RNA. Fed. Proc. 32, 586 (1973)

Marotta, C.A., Levy, C.C., Weissman, S.M. and Price, C.: Preferred sites of digestion of a ribonuclesae from Enterobacter sp. in the sequence analysis of Bacillus stearothermophilus 5S ribonucleic acid. Biochemistry 12, 2901-2904 (1973)

Mirzavekov, A.D. and Griffin, B.E.: 5S RNA conformation. Studies of its partial T1 RNase digestion by electrophoresis and two-dimentional thin layer chromatograpgy. J. Mol. Biol. 72, 633-643 (1972)

Monier, R.: Structure and Function of ribosomal RNA, in: The mechanismen of protein synthesis and its regulation. North Holland Publishing Co., Amsterdam (1972)

Monier, R.: 5S RNA, in: Ribosomes. Cold Spring Harbor Monograph Series (1974)

Nomura, M., Traub, P. and Bechmann, H.: Hybrid 30S ribosomal particles reconstituted from components of different bacterial origins. Nature 219, 793 (1968)

Nomura, M. and Erdmann, V.A.: Reconstitution of 50S ribosomal subunits from dissociated molecular components. Nature 228, 144-148 (1970)

Möller, W.: The ribosomal components involved in EF-G- and EF-TU-dependent GTP hydrolysis. In: siehe Monier

Ofengand, J. and Henes, C.: The influence of pseudouridylic acid in transfer ribonucleic acid. J. Mol. Biol. Chem. 244, 6241-6253 (1969)

Reinbolt, J. and Schiltz, E.: The primary structure of ribosomal protein S4 from E. coli. FEBS Letters 36, 250-252 (1973)

Richter, D., Erdmann, V.A. and Sprinzl, M.: A new transfer RNA fragment reaction: TpYpCpGp bond to a ribosom-messenger RNA complex induces the synthesis of guanosin tetra- and pentaphosphates. Proc. Nat. Acad. Sci.(US) 71, 3226-3229 (1974)

Rosset, R. and Monier, R.: Apropos de la prisence d'acide ribonucléique de faible molèculaire dans les ribosomes d'E. coli . Biochem. Biophys. Acta 68, 653-656 (1963)

Schaup, H.W., Sogin, M. Woese, C. and Kurland, C.G.: Characterisation of a RNA 'binding site' for a specific ribosomal ribosomal protein of E. coli. Mol. gen. Gent. 114, 1-8 (1971)

Shimizu, N., Nayashi, H. and Miura, R.: Functional sites of transfer RNA for the binding to messenger RNA-ribosome complex. J. Biochem., Tokyo, 67, 373-387 (1970)

Sogin, S.J., Sogin, M. and Woese, C.R.: Phylogenetic measurement

in procaryotes by primary structural charcterisation, J. Molec. Evolution 1, 173-184 (1972)

Stadler, H.: The primary structure of the 16S rRNA binding protein S8 from Escheichia voli ribosomes. FEBS Letters 48, 114-116 (1974)

Wittmann-Liebold, B.: Amiono acid sequence on ten ribosomal proteins of Ecsherichia coli with an improved sequenator equipped with an automatic conversion device. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 154, 1415-1431 (1973)

Wrede, P. and Erdmann, V.A.: Activities of Bacillus stearothermophilus 50S ribosomes reconstituted with procaryotic and eucaryotic 5S RNS. FEBS Letters 33, 315-319 (1973)

Zimmermann, R., Muto, A., Fellner, P. Ehresmann, C. and Branlant, C.: Localisation of ribosomal protein binding sites on 16S ribosomal RNA. Proc. Nat. Acad. (US) 69, 1282-1286 (1972)

G. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	= Abbildung
B. st.	= Bacillus stearothermophilus
E. c.	= Escherichia coli
RNS	= Ribonukleinsäure
rRNS	= ribosomale Ribonukleinsäure
A	= Adenosin-phosphat
G	= Guanosin-phosphat
U	= Uridin-phosphat
C	= Cytidin-phosphat
T	= Thymidin-phosphat
Y	= Pseudouridin-phosphat
T1-RNase	= Takadiastase T1 Ribonuklease
c.pm.	= Impulse pro Minute
U.p.M.	= Umdrehungen pro Minute
m	= molar
EDTA	= Äthylendiamin-tetra-azetat
Pi	= anorganisches Phosphat
Tris	= Tris-hydroxymethyl-aminomethan(2-Amino-2-hydroxymethylpropan 1,3-diol)
pppPpp	= Guanosinpentaphosphat
ppPpp	= guanosintetraphosphat
Ä.E.	= Äquivalente Einheiten

Die vorliegende Arbeit wurde im Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik unter der Leitung von Herrn Prof. H.G. Wittmann durchgefügrt. Ihm danke ich für die großzügige Unterstützung.
Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. V.A. Erdmann, der mit seinen Ratschlägen stets die Weiterführung dieser Arbeit förderte.
Herzlichen Dank sei auch denen ausgesprochen, die zum Gelingen dieser Arbeit beitrugen.

Lebenslauf

Am 21. November 1944 wurde ich als Sohn des Regierungsbauinspektors Fritz Zimmermann und seiner Ehefrau Friedel, geb.Horstmann, in Nordhemmern (Minden) geboren.

In Paderborn besuchte ich die Volksschule und das Gymnasium, wechselte den Wohnsitz nach Minden und legte dort am altsprachlichen Gymnasium im Frühjahr 1966 das Abitur ab.Im Wintersemester 1966 begann ich in Hannover das Studium des Maschinenbaus, wechselte nach drei Semestern das Studienfach und studierte seit Sommer 1968 in Berlin Biologie. Nach der Diplomvorprüfung im Sommer 1970 fertigte ich eine Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.G. Wittmann an.

Die Diplomprüfung legte ich im Februar 1973 ab und war seitdem an der vorliegenden Doktorarbeit am Max-Planck-Institut tätig.